

Camille Mertins Ribeiro

**EFEITOS COMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICOS DO ÁCIDO
ASCÓRBICO EM MODELOS DE DEPRESSÃO E MANIA**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós Graduação em Bioquímica da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Ana Lúcia
Severo Rodrigues

Coorientador: Prof.^a Dr.^a Morgana
Moretti

Florianópolis
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Ribeiro, Camille Mertins

Efeitos comportamentais e bioquímicos do ácido ascórbico
em modelos de depressão e mania / Camille Mertins Ribeiro
; orientadora, Ana Lúcia Severo Rodrigues ; coorientadora,
Morgana Moretti. - Florianópolis, SC, 2015.
86 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Bioquímica.

Inclui referências

1. Bioquímica. 2. Transtornos de humor. 3. Sistema
opióide. 4. Mania. I. Rodrigues, Ana Lúcia Severo. II.
Moretti, Morgana. III. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. IV. Título.

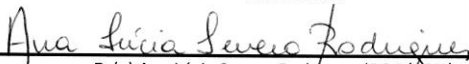
“Efeitos comportamentais e bioquímicos do ácido ascórbico em modelos de depressão e mania”

Por

Camille Mertins Ribeiro

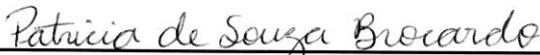
Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (009/BQA/UFSC) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica – UFSC, composta pelos doutores:

Orientador:

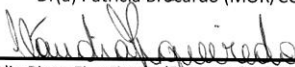


Dr(a) Ana Lúcia Severo Rodrigues (BQA/CCB/UFSC)

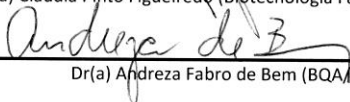
Banca examinadora:



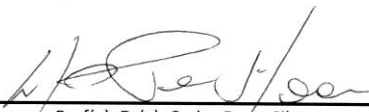
Dr(a) Patrícia Brocardo (MOR/CCB/UFSC)



Dr(a) Claudia Pinto Figueiredo (Biotecnologia Farmacêutica/CCS/UFRJ)



Dr(a) Andreza Fabro de Bem (BQA/CCB/UFSC)



Prof(a). Dr(a). Carlos Peres Silva
Coordenador(a) do Programa de Pós Graduação em Bioquímica

Florianópolis, 25 de fevereiro de 2015.

Este trabalho é dedicado à minha
família.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer...

Aos meus amados pais, Walmir e Anita, e irmãos, Diego e Tiago, pelo amor e apoio incondicionais.

Ao Lai, meu amor, pela paciência, companheirismo e por sempre me apoiar e ajudar em todos os momentos.

À minha orientadora, Ana Lúcia, por todos os ensinamentos, dedicação e confiança depositada. Pelo apoio e orientação neste trabalho. Muito obrigada!

À Morgana, minha coorientadora querida, por ter me adotado nesses dois anos de mestrado. Por todo o apoio e ajuda durante os experimentos, e por todo o conhecimento que me passou.

À Josi e à Samira, por terem aceitado e feito todo o possível para que o projeto da mania pudesse ser realizado.

Ao pessoal do Laboratório de Neurociências da UNESC, por terem me recebido de portas abertas durante os experimentos e por todo auxílio.

Aos amigos e parceiros de trabalho, Pri, Vivi, Morgs e Louis. Muito obrigada pelo companheirismo e ajuda nos experimentos!

Aos demais colegas do LANED, Anna, Colla, Dai, Francis, Júlia, Luana, Maurício e Nicolle. Às ex-colegas Andi e Ags. E as mais novas Profs, Pati e Manu. Obrigada pelos momentos de descontração e por toda a ajuda!

Aos professores da pós, por todo o conhecimento transmitido.

Às amigas de longa data, as Ju's, Cris, Fer, Téfi, Rô, Nessão e Paulinha, que continuam torcendo por mim mesmo de longe. Vocês são demais!

Às amigas da graduação, Amanda, Chê, Gabi, Leili, May e Rafa. Obrigada por me fazerem mais feliz, cada uma com o seu jeitinho.

A CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

Os transtornos de humor estão associados a altos índices de morbidade, mortalidade e custo econômico. O ácido ascórbico (AA) é uma vitamina hidrossolúvel cuja propriedade antidepressiva foi reportada em diversos estudos, além disso, essa vitamina tem uma potencial ação antimaníaca pouco explorada. O presente estudo investigou o envolvimento do sistema opióide no efeito tipo-antidepressivo do AA no teste de suspensão pela cauda (TSC), um modelo preditivo muito utilizado na investigação de novos compostos com ação antidepressiva. Além disso, esse estudo investigou também o possível efeito antimaníaco do AA em um modelo de mania induzido por m-anfetamina (m-AMPH). O tratamento de camundongos Swiss com um antagonista não seletivo de receptores opióides, naloxona, foi capaz de prevenir a diminuição no tempo de imobilidade causada pela administração de uma dose ativa de AA (1 mg/kg) no TSC. Adicionalmente, a administração de um antagonista específico de receptores opióides do tipo μ_1 , naloxonazina, também preveniu a ação tipo-antidepressiva da mesma dose de AA no TSC, sem causar alteração locomotora no teste do campo aberto (TCA). A administração de naloxonazina e AA não causou alteração significativa no imunoconteúdo de PSD95 em homogenatos de hipocampo e córtex pré-frontal dos animais. Em outro conjunto de experimentos, ratos Wistar foram tratados, duas vezes ao dia por 14 dias, com cloreto de lítio (LiCl, 45 mg/kg, p.o.), AA (0,1; 1; 10 e 100 mg/kg, p.o.) ou veículo (água destilada, 1ml/kg). A partir do 8º dia foi administrada uma injeção diária de m-AMPH (2 mg/kg, i.p.) ou veículo (salina, 1ml/kg). No 15º dia foi administrada uma dose única de m-AMPH e os animais foram testados no TCA após 2 horas. A m-AMPH aumentou a atividade locomotora e exploratória dos animais no campo aberto, e esse comportamento foi prevenido pelo tratamento com LiCl, mas não com AA. A análise do imunoconteúdo de BDNF no hipocampo dos animais mostrou um efeito principal da m-AMPH, a qual diminuiu o imunoconteúdo dessa proteína. No córtex pré-frontal, o grupo tratado com m-AMPH teve um aumento no imunoconteúdo de BDNF, que foi prevenido pelo tratamento com AA na dose de 10 mg/kg. O imunoconteúdo de FGF-2 não sofreu alteração significativa no hipocampo em nenhum dos grupos, mas houve um efeito principal da m-AMPH aumentando os níveis dessa neurotrofina no córtex pré-frontal. Nossos resultados mostram, primeiramente, que o efeito tipo-antidepressivo do AA no TSC parece ser dependente da ativação do sistema opióide, especialmente dos receptores do tipo μ_1 , e que, a

ativação da via mTOR-PSD95, apesar de estar envolvida no mecanismo tipo-antidepressivo do AA nesse teste, aparentemente não está relacionada à ativação do sistema opióide pelo AA. Adicionalmente, nossos resultados mostram que o AA não tem efeito no modelo animal de mania induzido por m-AMPH, e que a desregulação de BDNF e FGF-2 parece estar envolvida na manifestação de mania produzida por este modelo. Conjuntamente, nossos resultados podem ajudar no esclarecimento do papel do AA na regulação do humor.

Palavras chave: ácido ascórbico, transtornos de humor, depressão, sistema opióide, receptores μ_1 , PSD95, mania, m-AMPH, BDNF, FGF-2.

ABSTRACT

Mood disorders are associated with high levels of morbidity, mortality and a high economic cost. Ascorbic acid (AA) is a water-soluble vitamin whose antidepressant properties have been reported in several studies. Besides, this vitamin has a potential antimanic action that has not been explored yet. The present study investigated the involvement of the opioid system in the antidepressant-like effect of AA in the tail suspension test (TST), a predictive model widely used for the investigation of new antidepressant compounds. Furthermore, this study also investigated the possible antimanic effect of AA in an animal model of mania induced by m-amphetamine (m-AMPH). The treatment of Swiss mice with a non-selective opioid receptor inhibitor, naloxone, was able to prevent the reduced immobility time caused by an active dose of AA (1 mg/kg) in the TST. Additionally, the administration of a selective μ 1-opioid receptor antagonist, naloxonazine, also prevented the antidepressant-like action of the same dose of AA in the TST, without causing any locomotor alteration in the open field test (OFT). The administration of naloxonazine and AA did not cause any alteration in the immunocontent of PSD95 in hippocampus and prefrontal cortex homogenates. In another set of experiments, Wistar rats were treated, twice a day for 14 days, with lithium chloride (LiCl, 45 mg/kg, p.o.), AA (0.1; 1; 10 and 100 mg/kg, p.o.) or vehicle (distilled water, 1ml/kg). From the 8th to the 14th day, an injection of m-amphetamine (m-AMPH, 2 mg/kg, i.p.) or vehicle (saline, 1ml/kg) was administered. In the 15th day, a single administration of m-AMPH was given and the animals were subjected to the OFT after two hours. m-AMPH treatment increased locomotor and exploratory activity, and these behavioral alterations were prevented by the treatment with LiCl, but not AA. Regarding hippocampal BDNF immunocontent, we observed a main effect of m-AMPH treatment, which decreased the immunocontent of this protein. In the prefrontal cortex, the group treated with m-AMPH displayed an increased BDNF immunocontent, which was partially prevented by the treatment with LiCl and totally prevented by AA at 10 mg/kg. The immunocontent of FGF-2 was not altered in the hippocampus in any of the groups, but there was a main effect of m-AMPH increasing the level of this neurotrophin in the prefrontal cortex. Our results show, primarily, that the AA antidepressant-like effect in the TST seems to be dependent on the activation of the opioid system, especially μ 1-opioid receptor, and that, although mTOR-PSD95 pathway activation is implicated in the antidepressant-like effect of AA

in the TST, apparently it is not related to the activation of the opioid system by AA. Additionally, our results show that AA has no effect in the animal model of mania induced by m-AMPH, and that a BDNF and FGF-2 dysregulation seems to be involved in the mania manifestation caused by this model. Altogether, our results may help to understand the role of AA in mood regulation.

Keywords: ascorbic acid, mood disorders, depression, opioid system, μ 1-receptor, PSD95, mania, m-AMPH, BDNF, FGF-2.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Teoria monoaminérgica da depressão.	20
Figura 2. Bioquímica do AA.....	28
Figura 3. Protocolo experimental 1.....	36
Figura 4. Protocolo experimental 2.....	37
Figura 5. Protocolo experimental 3.....	38
Figura 6. Efeito do pré-tratamento com naloxona (1 mg/kg, i.p.) no efeito anti- imobilidade do AA no TSC (painel A) e na locomoção no TCA (painel B).	44
Figura 7. Efeito do pré-tratamento dos animais com naloxonazina (10 mg/kg, i.p.) no efeito anti-imobilidade do AA no TSC (Painel A) e na atividade locomotora no TCA (painel B).	46
Figura 8. Efeito do tratamento com naloxonazina (10 mg/kg, i.p.) e/ou AA sobre o imunocontéudo de PSD95 no hipocampo (painel A) e córtex pré-frontal (painel B) de camundongos.	48
Figura 9. Efeito do LiCl no modelo de mania induzida por m-AMPH sobre a número de cruzamentos (painel A) e de levantamentos (painel B) dos animais no TCA.	50
Figura 10. Efeito do AA no modelo de mania induzida por m-AMPH sobre a número de cruzamentos (painel A) e de levantamentos (painel B) dos animais no TCA.	51
Figura 11. Efeito do pré-tratamento dos animais com AA ou LiCl no modelo de mania induzido por m-AMPH no imunocontéudo de BDNF no hipocampo (painel A) e córtex pré-frontal (painel B) de ratos.	53
Figura 12. Efeito do pré-tratamento dos animais com AA ou LiCl no modelo de mania induzido por m-AMPH no imunocontéudo de FGF-2 no hipocampo (painel A) e córtex pré-frontal (painel B) de ratos.	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA – Ácido Ascórbico
ANOVA – Análise de variância
BDNF – Fator neurotrófico derivado do encéfalo
CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais
CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DSM-V – V Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais
EROs – Espécies reativas de oxigênio
FGF – Fator de crescimento de fibroblastos
GDNF – Fator neurotrófico derivado da glia
HPA – Hipotálamo-pituitária-adrenal
LiCl – Cloreto de lítio
m-AMPH – m-anfetamina
mTOR – Proteína alvo da rapamicina em mamíferos
NMDA – N-metil-D-aspartato
NO – Óxido nítrico
OMS – Organização Mundial de Saúde
PKC – Proteína cinase C
PSD95 – Proteína pós-sináptica de densidade 95
TCA – Teste do campo aberto
THB – Transtorno de humor bipolar
TNF – Teste do nado forçado
TNF- α – Fator de necrose tumoral- α
TrkB – Tropomiosina cinase B
TSC – Teste de suspensão pela cauda
VEGF – Fator de crescimento vascular endotelial

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1 <i>TRANSTORNOS DE HUMOR</i>	19
1.1.1 Depressão	19
1.1.1.1 Considerações gerais	19
1.1.1.2 Bases etiológicas	20
1.1.1.3 Tratamento	22
1.1.2 Transtorno de humor bipolar (THB)	22
1.1.2.1 Considerações gerais	22
1.1.2.2 Bases etiológicas	23
1.1.2.3 Tratamento	24
1.2 <i>MODELOS ANIMAIS</i>	25
1.3 <i>ÁCIDO ASCÓRBICO (AA)</i>	26
1.3.1 Características gerais	26
1.3.2 AA e transtornos de humor	28
2. JUSTIFICATIVA	31
3. OBJETIVOS.....	33
3.1 <i>OBJETIVO GERAL</i>	33
3.2 <i>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</i>	33
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1 <i>ANIMAIS</i>	35
4.2 <i>DROGAS</i>	35
4.3 <i>INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO ANTIDEPRESSIVA DO AA</i>	36
4.4 <i>INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DO AA EM MODELO ANIMAL DE MANIA</i>	37
4.5 <i>AVALIAÇÕES COMPORTAMENTAIS.....</i>	38
4.5.1 TSC	38
4.5.2 TCA.....	38
4.6 <i>AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS – IMUNODETECÇÃO DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT.....</i>	39
4.7 <i>ANÁLISE ESTATÍSTICA</i>	40

5. RESULTADOS.....	43
5.1 INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO ANTIDEPRESSIVA DO AA	43
5.1.1 Envolvimento do sistema opióide na ação tipo-antidepressiva do AA no TSC e na atividade locomotora no TCA	43
5.1.2 Envolvimento dos receptores opióides do tipo $\mu 1$ no efeito tipo-antidepressivo do AA no TSC e a atividade locomotora no TCA.....	44
5.1.3 Envolvimento da proteína sináptica PSD95 no efeito inibitório da naloxonazina sobre a ação tipo-antidepressiva do AA	46
5.2 INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DO AA NO MODELO DE MANIA INDUZIDO POR m-AMPH.....	49
5.2.1 Efeito da administração repetida de AA no modelo de mania induzida por m-AMPH sobre a locomoção e o número de levantamentos dos animais no TCA.....	49
5.2.2 Influência do modelo de mania induzida por m-AMPH sobre o imunoconteúdo hipocampal e cortical de BDNF em ratos tratados ou não com LiCl ou AA	51
5.2.3 Influência do modelo de mania induzida por m-AMPH sobre o imunoconteúdo hipocampal e cortical de FGF-2 em ratos tratados ou não com LiCl ou AA	54
6. DISCUSSÃO	57
7. CONCLUSÕES	65
8. PERSPECTIVAS.....	67
9. REFERÊNCIAS	69

1. INTRODUÇÃO

1.1 TRANSTORNOS DE HUMOR

Os transtornos de humor são há muito conhecidos, manuscritos da Grécia e Pérsia antigas já mencionavam alterações nas emoções, e os termos “mania” e “melancolia” já haviam sido usados por Hipócrates, cerca de 400 anos de Cristo (Alcântara *et al.*, 2003). Mesmo assim, segundo a Organização Mundial de Saúde, este grupo de transtornos mentais ainda causa muitos prejuízos à população mundial.

1.1.1 Depressão

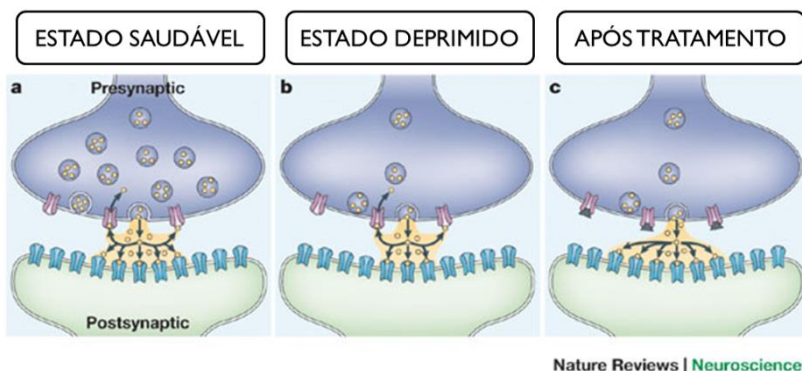
1.1.1.1 Considerações gerais

A depressão é um transtorno debilitante e altamente prevalente, acometendo mais de 350 milhões de pessoas em todo o mundo (Organização Mundial de Saúde, 2012). Atualmente, é considerada um dos maiores problemas de saúde pública mundial, especialmente no ocidente (Nestler e Carlezon, 2006; Nakajima *et al.*, 2010; Olesen e Leonardi, 2003). Aproximadamente um a cada seis homens e uma a cada quatro mulheres vão passar por um episódio de depressão durante a vida (Wittchen *et al.*, 1994). Nos piores casos, a depressão pode levar ao suicídio, que, segundo a Organização Mundial de Saúde, é a causa da morte de aproximadamente um milhão de pessoas todos os anos.

O diagnóstico para a depressão maior baseia-se na observação clínica dos sintomas e critérios estabelecidos pela Associação Americana de Psiquiatria. O Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-V) caracteriza o transtorno depressivo maior quando um indivíduo apresenta cinco ou mais dos seguintes sintomas: 1) humor deprimido; 2) anedonia (perda de interesse ou prazer por quase todas as atividades); 3) alterações do apetite ou peso; 4) insônia ou hipersônia; 5) retardo ou agitação psicomotora; 6) fadiga ou perda de energia; 7) sentimento de desvalia ou culpa excessiva; 8) diminuição da concentração ou indecisão e 9) pensamentos de morte, incluindo ideação suicida, planos ou tentativas de suicídio. É importante ressaltar que esses sintomas devem estar presentes por um período mínimo de duas semanas, sendo que pelo menos um deve ser humor deprimido ou anedonia durante a maior parte do tempo.

1.1.1.2 Bases etiológicas

Apesar de todos os mecanismos biológicos subjacentes à depressão não terem sido ainda totalmente elucidados, já foi possível a identificação do envolvimento de diversos alvos moleculares na fisiopatologia desse transtorno. Sabe-se que a depressão pode ser o resultado, pelo menos em parte, de uma deficiência na atividade monoaminérgica no encéfalo (Elhwuegi, 2004). Essa hipótese postula que a depressão ocorreria devido a uma redução nos níveis de monoaminas (serotonina, dopamina e noradrenalina) na fenda sináptica. Essa proposição é apoiada pelo mecanismo de ação da maioria dos antidepressivos clássicos, que aumentam os níveis de monoaminas disponíveis na fenda sináptica (Figura 1) (Cummings, 1993; Elhwuegi, 2004; Prins *et al.*, 2011).



Nature Reviews | Neuroscience

Figura 1. Teoria monoaminérgica da depressão. I. No cérebro normal os neurotransmissores monoaminérgicos são liberados e ativam receptores pós-sinápticos. A neurotransmissão é terminada pela recaptação do neurotransmissor no neurônio pré-sináptico. II. Na depressão, a concentração de monoaminas na fenda sináptica está diminuída, acarretando o transtorno de humor. III. O bloqueio dos sítios de recaptação aumenta a disponibilidade dos neurotransmissores monoaminérgicos, os quais ativam seus receptores pós-sinápticos, e o humor é restabelecido (Castrén, 2005).

Mesmo bem estabelecida, a hipótese monoaminérgica da depressão não é capaz de explicar o complexo mecanismo desse transtorno. Diversos outros sistemas neurais e mecanismos de transdução de sinal estão implicados na fisiopatologia da depressão. Entre eles estão, o sistema glutamatérgico, principalmente via receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) e a via L-arginina-óxido nítrico (NO)

(Harkin *et al.*, 1999; Sanacora *et al.*, 2008; Zomkowski *et al.*, 2010), o sistema GABAérgico (Nakagawa *et al.*, 1996; Cryan e Slaterry, 2010), canais de cálcio (Galeotti *et al.*, 2006), aumento nos níveis plasmáticos de glicocorticoides e desregulação no eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA) (Perera *et al.*, 2007; Pittenger e Duman, 2008; Kunugi *et al.*, 2010). A depressão também pode ser desencadeada por um aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), as interleucinas-1 e 6 e o interferon- α (Maes *et al.*, 2009; Miller *et al.*, 2009; Kaster *et al.*, 2012), por exposição a eventos estressantes durante a vida do indivíduo (Henn e Vollmayre, 2005; Mann e Currier, 2010) ou ainda por alterações em vias de sinalização celular que regulam a sobrevivência e a neuroplasticidade celular (Picchinni *et al.*, 2004; Perera *et al.*, 2007; Beaulieu *et al.*, 2009; Numakawa *et al.*, 2010).

Outro sistema de neurotransmissores que está envolvido com a fisiopatologia da depressão é o sistema opióide. Primeiramente, uma alta concentração de peptídeos opióides é encontrada em regiões límbicas envolvidas com a regulação do humor (Mansour *et al.*, 1988). Além disso, os opióides são conhecidos por alterar o humor; por exemplo, a ativação do receptor μ -opióide produz euforia, enquanto a retirada de opióide após um período prolongado de uso pode induzir sintomas semelhantes à depressão. Estudos clínicos demonstraram que a concentração do peptídeo opióide β -endorfina está diminuída em pacientes deprimidos e que estes níveis retornam ao normal após o tratamento com fluvoxamina (Djurovic *et al.*, 1999) e ainda, que a administração de β -endorfina possui propriedades antidepressivas (Kline *et al.*, 1977, Catlin *et al.*, 1980). De forma semelhante, foi sugerido que alguns ligantes de opióides, como a ciclazocina, buprenorfina, oxicodona e oximorfona tenham propriedades antidepressivas em pacientes com depressão refratária ou resistente ao tratamento (Bodkin *et al.*, 1995; Stoll e Rueter, 1999). Adicionalmente, foi relatado que pacientes depressivos possuem uma deficiência na atividade opióide endógena (Pickar *et al.*, 1980) e um estudo mostrou que os receptores μ -opióides se encontram ativados durante a aceitação de um episódio de rejeição e que pacientes depressivos possuem essa ativação diminuída (Hsu *et al.*, 2015). Em testes pré-clínicos nosso grupo mostrou que antagonistas de receptores opióides são capazes de abolir o efeito tipo-antidepressivo de alguns compostos, tais como agmatina, adenosina e ácido fólico em testes preditivos de ação antidepressiva (Zomkowski *et al.*, 2005; Kaster *et al.*, 2007; Brocardo *et al.*, 2009). Desta forma, o efeito terapêutico de alguns antidepressivos, principalmente na

depressão severa, poderia estar relacionado com a modulação do sistema opióide (Schreiber *et al.*, 2002).

Recentemente, Duman e colaboradores (2010) demonstraram que o efeito tipo-antidepressivo rápido da cetamina é dependente da ativação da via da proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) e desde então a implicação desta via na fisiopatologia da depressão tem sido muito estudada. A ativação de mTOR se dá através da fosforilação do complexo 1 mTOR (mTORC1) pela proteína cinase B, popularmente conhecida como Akt. O complexo mTORC 1 ativado favorece a tradução de proteínas sinápticas, com destaque para subunidades de receptores glutamatérgicos AMPA (GluR1) e proteínas de ancoragem desses receptores, como as proteínas de densidade pós-sináptica de 95 kDa (PSD95), por fim, este aumento de proteínas na fenda sináptica é relacionado ao aumento da sinaptogênese, e consequente melhora nos sintomas depressivos (Duman *et al.*, 2012).

1.1.1.3 Tratamento

Atualmente, existem várias classes de antidepressivos disponíveis para o tratamento da depressão, incluindo os tricíclicos, os inibidores da monoamina oxidase, os inibidores seletivos da recaptação de serotonina e os inibidores mistos da recaptação de serotonina e noradrenalina (Berton e Nestler, 2006; Nemeroff, 2007). Apesar da diversidade de fármacos, ainda existe uma lacuna entre o início do tratamento farmacológico e o efeito terapêutico, mesmo que parcial, desses medicamentos. Levando em consideração que apenas cerca de 60 % dos pacientes são responsivos ao tratamento (Gareri *et al.*, 2000; Berton e Nestler, 2006), e que os fármacos atuais possuem muitos efeitos colaterais, o que causa um abandono do tratamento em muitos casos (Nestler *et al.*, 2002), há uma forte necessidade do desenvolvimento de novos fármacos mais efetivos para o tratamento da depressão.

1.1.2 Transtorno de humor bipolar (THB)

1.1.2.1 Considerações gerais

O THB é uma psicopatologia crônica e uma das 20 maiores causas de incapacitação ao redor do mundo (OMS, 2004). Tal transtorno apresenta uma alta prevalência, afetando mundialmente cerca de 29 milhões de pessoas (OMS, 2004), além de estar associado a altas taxas de suicídio (Khan *et al.*, 2013).

O THB é caracterizado pela presença de episódios de mania interpostos a episódios depressivos, que podem ser desencadeados de forma mais frequente e grave durante o curso do transtorno. Segundo o V Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, o diagnóstico do THB, baseado na fase maníaca, requer humor persistente e anormalmente elevado, expansivo ou irritável, durando pelo menos uma semana. Além dessa alteração do humor, pelo menos três dos seguintes sintomas devem estar presentes: grandiosidade, necessidade diminuída de sono, pressão para falar, fuga de ideias, distratibilidade, aumento da atividade dirigida a objetos ou agitação psicomotora e envolvimento excessivo em atividades prazerosas. Por outro lado, na fase de depressão, os pacientes podem apresentar sintomas como humor deprimido, anedonia, irritabilidade, dificuldades de concentração e anormalidades no apetite (Krishnan e Nestler, 2008).

1.1.2.2 Bases etiológicas

Assim como na depressão, as primeiras hipóteses formuladas para explicar a fisiopatologia do THB focaram o sistema monoaminérgico (Young *et al.*, 1994), postulando que haveria uma mudança na atividade dopaminérgica, serotoninérgica e noradrenérgica (Vawter *et al.*, 2000; Müller-Oerlinghausen *et al.*, 2002; Brugue e Vieta, 2007). Prange e colaboradores (1974) formularam a hipótese permissiva, na qual um déficit na neurotransmissão serotoninérgica central permitiria a expressão tanto da fase maníaca, quanto da depressiva; contudo, tais fases difeririam em relação aos níveis de catecolaminas (noradrenalina e dopamina) centrais, que estariam elevadas na mania e diminuídas na depressão. Para Shiah e Yatham (2000) haveria uma função serotoninérgica central diminuída, associada a uma função noradrenérgica aumentada na gênese da mania. Ainda sobre a fase maníaca do THB, é descrito um aumento nos níveis plasmáticos, urinários e no líquido do ácido homovalínico (HVA), um metabólito da dopamina (Potter *et al.*, 1987). Além disso, as anfetaminas, substâncias que aumentam a liberação de dopamina, são capazes de induzir mania e antipsicóticos, que antagonizam receptores dopaminérgicos, são eficazes agentes antimaniacos (Brown *et al.*, 2001).

As manifestações comportamentais e fisiológicas do THB são muito complexas e ainda não são totalmente elucidadas. Uma hipótese que vem ganhando espaço nos últimos tempos é a de um desbalanço nos níveis de neurotrofinas (Berk *et al.*, 2011), moléculas chave na regulação da sobrevivência e morte neuronal, estando envolvidas na

plasticidade sináptica e resiliência celular, o que é cada vez mais reconhecido como sendo de vital importância nos transtornos de humor (Grande *et al.*, 2014). Diversos fatores neurotróficos são associados ao THB, entre eles o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), as neurotrofinas 3 e 4/5, o fator neurotrófico derivado da glia (GDNF), o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e o fator de crescimento de fibroblastos (FGF) (Berk *et al.*, 2011; Rosa *et al.*, 2006; Walz *et al.*, 2007, 2009).

O BDNF é sintetizado no Complexo de Golgi como pró-BDNF, o qual é clivado em BDNF maduro e transportado por vesículas a axônios e dendritos e liberado no espaço extracelular. Sua ligação ao receptor do tipo tropomiosina cinase (TrkB) ativa as vias da proteína cinase C (PKC), da proteína cinase B (Akt) e da cinase ativada por estímulos extracelulares (ERK) e sinaliza neurogênese e sobrevivência celular (Lu *et al.*, 2005). Já foi reportada uma diminuição nos níveis de BDNF durante episódios agudos de mania, sendo que tal redução foi positivamente correlacionada com a severidade dos episódios (Cunha *et al.*, 2006; Machado-Vieira *et al.*, 2007; Fernandes *et al.*, 2009). Outro estudo mostrou que pacientes bipolares responsivos ao tratamento apresentam níveis séricos de BDNF rapidamente aumentados após a resolução do episódio (Tramontina *et al.*, 2009).

Sabe-se que o FGF é um importante fator de diferenciação de neurônios no hipocampo, e também que pacientes com THB possuem o volume hipocampal reduzido (Strasser *et al.*, 2005). Mudanças no FGF e seu receptor FGFR1 foram descritas no encéfalo de pacientes com THB, sugerindo que uma desregulação na sinalização do FGF pode estar envolvida no desenvolvimento e função cerebral anormal associada com esse transtorno (Gaughran *et al.*, 2006). Um estudo demonstrou que a família dos FGF's é o conjunto de genes mais alterado dentro de todo o transcriptoma de indivíduos com depressão maior, que apresentam uma diminuição dos níveis de FGF2, especificamente (Evans *et al.*, 2004). Já foi demonstrado ainda que o aumento nos níveis de BDNF (Lee *et al.*, 2002) e FGF2 (Yoshimura *et al.*, 2003; Wada *et al.*, 2003) é capaz de atenuar a perda de volume hipocampal e aumentar a neurogênese após diversos estressores, reforçando o envolvimento desses fatores de crescimento na fisiopatologia do THB.

1.1.2.3 Tratamento

O tratamento farmacológico para o THB visa estabilizar o humor dos pacientes e reduzir o número de passagens entre a fase maníaca e a

fase depressiva. Entretanto, apesar dos esforços e avanços no tratamento do transtorno, apenas 1/3 dos pacientes diagnosticados com THB retomam suas atividades sociais e ocupacionais após o tratamento (Huxley e Baldessarini, 2007).

O Lítio (LiCl) é classicamente utilizado no tratamento dos sintomas do THB, e mais recentemente, o Valproato também tem sido muito utilizado para esse fim. Ambos possuem eficaz ação antimaníaca e modesta ação antidepressiva. Seus mecanismos de ação ainda não são totalmente conhecidos, mas sabe-se que envolvem a modulação de diversos sistemas de neurotransmissores e cascatas de sinalização intracelulares (Niciu *et al.*, 2013).

1.2 MODELOS ANIMAIS

O desenvolvimento de modelos animais é muito importante para o estudo dos quadros de transtornos de humor, tanto para elucidar os mecanismos envolvidos nessas fisiopatologias, quanto para a obtenção de novos tratamentos farmacológicos. Para ser válido, um modelo animal em transtorno psiquiátrico deve demonstrar três características principais: os agentes terapêuticos usados no tratamento devem reverter os sintomas induzidos no modelo animal (validade preditiva), mimetizar os sintomas da doença (validade de face) e ser hábil em reproduzir alguns aspectos fisiopatológicos da doença (validade de construção) (Ellenbroek e Cools, 1990).

Para investigar a fisiopatologia da depressão e possibilitar o desenvolvimento de novos fármacos antidepressivos que atuem em distintos alvos farmacológicos, é imprescindível a utilização de modelos animais de depressão. Entre esses modelos estão o teste do nado forçado (TNF) (Porsolt *et al.*, 1977; 1978), utilizado em ratos e camundongos e o teste de suspensão pela cauda (TSC), utilizado em camundongos e primeiramente descrito por Steru *et al.* (1985). Esses dois são modelos animais preditivos para a ação antidepressiva de um composto ou fármaco. Nesses testes comportamentais mensura-se o tempo de imobilidade dos animais submetidos à situação de estresse do nado forçado ou da suspensão pela cauda, sendo que compostos que exibem um efeito tipo-depressivo aumentam esse tempo, enquanto que antidepressivos clássicos ou compostos com potencial tipo-antidepressivo causam uma diminuição no tempo de imobilidade dos animais nesses testes.

O padrão oscilante do THB dificulta o desenvolvimento de modelos adequados, que abranjam todas as fases do mesmo. Como o

marco clínico para o diagnóstico de THB são os sintomas maníacos (Belmaker, 2004), foca-se no desenvolvimento de modelos animais que reproduzam a manifestação de um único episódio maníaco, com sintomas tais como euforia, irritabilidade, agressividade, hiperatividade, insônia ou atividade sexual aumentada (Ellenbroek e Cools, 1990).

Sabe-se que a anfetamina induz sintomas maníacos em pacientes com THB (Joyce *et al.*, 1995). Adicionalmente, estudos realizados com ratos tratados com anfetamina demonstraram que a administração desse psicoestimulante produz hiperlocomoção, alteração das fases do sono e anorexia, assemelhando-se às manifestações clínicas da mania (Einat *et al.*, 2007). Em adição, o tratamento com fármacos estabilizadores do humor, tais como LiCl e Valproato, é capaz de reverter a hiperlocomoção induzida pela anfetamina em ratos (Frey *et al.*, 2006).

Dados da literatura mostram ainda que a administração de anfetamina em animais provoca modificações cerebrais semelhantes ao que é observado em pacientes com THB, tais como diminuição dos níveis de BDNF (Frey *et al.*, 2006), parâmetros também normalizados com o tratamento com LiCl e Valproato.

Considerando o exposto, a administração de anfetamina é considerada um modelo animal de mania válido (Cappelliez e Moore 1990; Einat *et al.*, 2007; Young *et al.*, 2010; Szabo *et al.*, 2009), visto que possui boa validade preditiva, de face e de constructo. Desta forma, pesquisas com este modelo envolvendo a manipulação de alvos terapêuticos possivelmente envolvidos no THB são importantes para auxiliar na compreensão da fisiopatologia e para o desenvolvimento de futuras alternativas de tratamento para esse transtorno.

1.3 ÁCIDO ASCÓRBICO (AA)

1.3.1 Características gerais

O L-ácido ascórbico (Figura 2), popularmente conhecido como vitamina C, é uma vitamina hidrossolúvel com propriedades neuroprotetoras e antioxidantes (Rice, 2000). Foi encontrado pela primeira vez por Szent-Gyorgy como um agente redutor na glândula adrenal, em 1928 (Grunewald, 1993).

O AA teve seu nome originado devido ao fato de conferir proteção contra o escorbuto, doença causada devido à grave carência de vitamina C (Schanderl, 1970). Nos mamíferos, em pH fisiológico, essa molécula se ioniza liberando um próton, passando a se chamar ascorbato (Rebec e Pierce, 1994). Muitos mamíferos possuem a capacidade de

sintetizar o ascorbato no fígado, mas humanos não são capazes de sintetizá-lo, devido à ausência da enzima L-gulonolactona oxidase, necessária para o último passo da biossíntese. Esse fato não é prejudicial, pois essa vitamina pode ser facilmente encontrada na dieta, e subsequentemente captada no intestino por uma família de transportadores específicos (Rice, 2000). Após a sua captação, ela entra na corrente sanguínea e é amplamente distribuída pelo organismo, podendo atravessar a barreira hematoencefálica através de transportadores de glicose (Agus *et al.*, 1997). Junto com a glutatona, é um dos antioxidantes de baixo peso molecular mais abundantes em tecidos encefálicos de mamíferos (Zarebkohan e Naini, 2011). Vale ressaltar que os níveis de ascorbato no encéfalo chegam a 10 vezes os seus níveis sanguíneos, principalmente por sua ação antioxidante e neuromoduladora sobre diferentes sistemas de neurotransmissores. Esta vitamina possui uma distribuição assimétrica no sistema nervoso central, com maiores concentrações em estruturas muito relacionadas com a modulação do humor, como córtex, hipocampo e amígdala (Agus *et al.*, 1997; Harrison e May, 2009), sendo que sua concentração no encéfalo muda rapidamente em resposta à atividade neuronal, principalmente em relação a atividade glutamatérgica. Este fato reforça seu papel como agente neuromodulador e neuroprotetor no encéfalo (Grünwald, 1993).

O ascorbato atua como antioxidante endógeno (Schreiber e Trojan, 1991; Naidu, 2003), podendo reagir com espécies reativas de oxigênio (EROs) e estabilizar radicais livres produzidos durante o metabolismo celular (Padayatty *et al.*, 2003). Ainda existem relatos de que essa vitamina pode ter efeitos benéficos sobre a memória (Harrison *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2009), ação antitumoral (Chen *et al.*, 2008), antinociceptiva (Rosa *et al.*, 2005) e efeito neuroprotetor contra isquemia (Stamford *et al.*, 1999) e convulsões (Freitas e Tomé, 2010). O AA apresenta ainda uma importante ação neuromoduladora, tanto sobre a neurotransmissão dopaminérgica como glutamatérgica (Grünwald, 1993; Rebec e Pierce, 1994; Rice, 2000). O ânion ascorbato é liberado dos neurônios glutamatérgicos como parte do processo de recaptação do glutamato, no qual o transportador de glutamato de alta afinidade troca ascorbato por glutamato. Este processo pode ocorrer também em células gliais, garantindo um elevado nível de ascorbato extracelular em muitas regiões do encéfalo (Rebec e Pierce, 1994; Rice, 2000). Atualmente o ácido ascórbico é muito usado como suplementação vitamínica, sendo consumido sob diversas formas sólidas como cápsulas, drágeas, comprimidos efervescentes, bem como em formas líquidas (NAIDU, 2003).

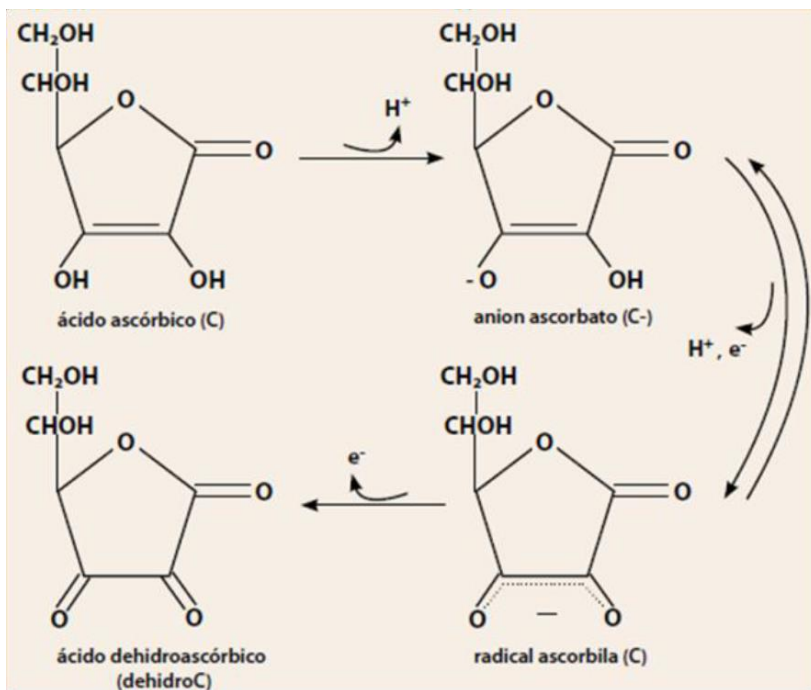


Figura 2. Bioquímica do AA. Em pH fisiológico de mamíferos, o AA é encontrado sob a forma de ânion ascorbato. A estrutura do ascorbato permite a perda de elétrons e assim sua oxidação em um processo reversível de duas etapas. Inicialmente o ascorbato é oxidado através da perda de um elétron, formando um radical intermediário chamado de radical ascorbila ou semi-dehidroascorbato. Através da perda de um segundo elétron e desprotonação, esse é oxidado a ácido dehidroascórbico ou dehidroascorbato.

1.3.2 AA e transtornos de humor

Começou a se sugerir um papel para o AA nos transtornos de humor a partir de relatos da capacidade desta vitamina em aliviar sintomas depressivos. Apesar de ser apenas um caso, foi relatado que a administração de AA aliviou a depressão induzida pelo hormônio adrenocorticotrófico em uma criança (Cocchi *et al.*, 1980) e o tratamento com AA por 14 dias diminuiu escores no inventário Beck de depressão, utilizado tipicamente para medir a intensidade de episódios depressivos, em indivíduos saudáveis (Brody, 2002), indicando uma

melhora no humor. Outro estudo verificou uma diminuição dos níveis de AA no plasma de pacientes com depressão maior (Khanzode *et al.*, 2003), e foi relatado ainda o caso de um paciente com depressão maior que desenvolveu escorbuto (Chang *et al.* 2007), o que sugere que uma baixa ingestão de AA, e consequente diminuição dos níveis endógenos do mesmo, pode estar relacionada com a patogênese da depressão. Esses achados são corroborados por um estudo subsequente que mostrou que uma dieta rica em vitamina C está associada com uma diminuição dos sintomas depressivos em idosos (Oishi *et al.*, 2009). Mais recentemente foi demonstrado que a administração combinada de AA e fluoxetina é mais eficaz em diminuir os sintomas depressivos quando comparado com o tratamento somente com fluoxetina (Amr *et al.*, 2013).

Em camundongos, a administração de AA produziu um efeito tipo-antidepressivo no TSC por um mecanismo dependente da interação dessa vitamina com os sistemas monoaminérgicos (Binfaré *et al.*, 2009a), com receptores NMDA e a via L-arginina-NO-monofosfato cíclico de guanosina (Moretti *et al.*, 2011) e com a modulação da proteína alvo da rapamicina (mTOR) (Moretti *et al.*, 2014). Reforçando a ideia de que essa vitamina pode ser uma alternativa no tratamento dos sintomas da depressão, nosso grupo demonstrou que o tratamento repetido com AA, semelhante à fluoxetina, reverteu o comportamento tipo-depressivo e o dano oxidativo cerebral induzido pelo estresse crônico em camundongos (Moretti *et al.*, 2012a). Ainda, foi relatado que ratos submetidos ao modelo de estresse crônico moderado apresentam uma redução do conteúdo de AA no córtex cerebral (Eren *et al.*, 2007).

Vários estudos demonstram que o AA inibe a ligação dos agonistas de dopamina e antagonistas radiomarcados em homogenatos de tecido cerebral (Heikkila, 1981; Kayaalp e Neff, 1980; Tolbert *et al.*, 1992). Alguns estudos sugerem que esse efeito poderia ser produzido por meio da ação direta do AA sobre os receptores de dopamina (Kayaalp e Neff, 1980; Tolbert *et al.*, 1992). Da mesma forma, o AA também atenua a capacidade que algumas drogas têm de liberar dopamina no estriado e núcleo acumbens. Por exemplo, o pré-tratamento com AA reduz a depleção de dopamina induzida por 1-metil-4-fenil piridínio (MPP+) (Wagner *et al.*, 1986). Além disso, estudos demonstraram que o AA reverte alterações comportamentais induzidas por agonistas dopaminérgicos. O pré-tratamento com AA preveniu a hiperatividade (Heikkila *et al.*, 1981; White *et al.*, 1990) e o comportamento estereotipado (Tolbert *et al.*, 1979) induzido pela administração de anfetamina em ratos, indicando um possível efeito antimaníaco dessa vitamina. Considerando essas evidências, mais

estudos são necessários no sentido de esclarecer o papel e os mecanismos de ação do AA nos transtornos de humor.

2. JUSTIFICATIVA

Os transtornos de humor estão associados a importantes níveis de morbidade, mortalidade e elevado custo econômico para a sociedade (Picchini *et al.*, 2004; Prince *et al.*, 2007), possuem também alta prevalência na população mundial. Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde, cerca de 12% da população mundial apresentará algum transtorno de humor ao longo da vida (Kessler *et al.*, 2009).

A depressão é uma das doenças neuropsiquiátricas mais prevalentes, causa uma considerável morbidade psiquiátrica, perda de produtividade e alto risco de suicídio (Ebmeier *et al.*, 2006). A terapia para a depressão não tem sido totalmente eficaz e, em muitos casos, está associada a efeitos colaterais indesejados, o que prejudica a adesão do paciente ao tratamento (Nestler *et al.*, 2002). Além disso, os tratamentos atuais possuem uma grande janela de resposta terapêutica (cerca de 3 a 5 semanas) e apenas cerca de 60% dos pacientes são responsivos a esses tratamentos (Gareri *et al.*, 2000; Berton e Nestler, 2006). Sendo assim, há uma grande demanda por novos fármacos com ação rápida, segura e efetiva para a depressão (Berton e Nestler, 2006).

No que diz respeito à farmacoterapia para o THB, o cenário é semelhante ao descrito para a depressão. Apesar dos recentes progressos alcançados no desenvolvimento de estabilizadores de humor, tais fármacos não são eficazes para todos os pacientes. Sabe-se que o tratamento para o THB é paliativo, longo e não atende a casos refratários da doença (Müller-Oerlinghausen *et al.*, 2002). Essa situação exige novas abordagens no tratamento desse transtorno, especialmente em aspectos relacionados ao desenvolvimento de terapias alternativas ou de substâncias que possam aumentar a eficácia clínica dos tratamentos já disponíveis.

Adicionalmente, existem relatos de que o AA possui efeito antidepressivo em estudos pré-clínicos (Binfaré *et al.*, 2009; Moretti *et al.*, 2011) e clínicos (Cocchi *et al.*, 1980; Brody, 2002), e por este motivo faz-se necessário a melhor compreensão dos mecanismos moleculares de ação dessa vitamina. Por outro lado, além do já caracterizado efeito antidepressivo do AA, existem evidências sugerindo que tal vitamina pode possuir propriedades antimaníacas (Tolbert *et al.*, 1979; Heikkila *et al.*, 1981; White *et al.*, 1990), o que torna interessante a investigação da ação desse composto em um modelo animal de mania. Desta forma, poderíamos estender o conhecimento dos alvos bioquímicos diretos e indiretos envolvidos no efeito de regulação do humor pelo AA.

Considerando o exposto, no que diz respeito aos transtornos psiquiátricos, este trabalho tem como hipótese: a) que o AA exerça uma ação antidepressiva via modulação do sistema opióide, o que poderia indicar um efeito promissor em casos de depressão refratária; b) que o AA exerça uma ação antimaníaca, podendo vir a se constituir em uma alternativa aos tratamentos farmacológicos atuais.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Expandir a compreensão dos efeitos do AA nos transtornos de humor, especificamente na depressão maior e no THB, identificando um possível envolvimento do sistema opióide no efeito tipo-antidepressivo do AA, além de investigar o efeito desta vitamina em um modelo animal de mania induzido por m-anfetamina (m-AMPH).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar o efeito do tratamento com naloxona (antagonista não seletivo de receptores opióides) ou naloxonazina (antagonista μ 1-opiíde) sobre o comportamento tipo-antidepressivo do AA no TSC e no teste do campo aberto (TCA)
- Avaliar o imunoconteúdo de PSD95 no hipocampo e córtex pré-frontal de camundongos após a administração concomitante de AA e naloxonazina (antagonista μ -opiíde).
- Avaliar a atividade locomotora após a administração de AA em modelo animal de mania induzido por m-AMPH em ratos Wistar.
- Avaliar o imunoconteúdo de FGF-2 e BDNF no hipocampo e córtex pré-frontal de ratos após a administração de AA no modelo animal de mania induzido por m-AMPH.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Para a investigação do envolvimento do sistema opióide no efeito tipo-antidepressivo do AA foram usados camundongos Swiss fêmeas, pesando entre 30 e 40g, com cerca de 50 dias de idade. Os animais foram mantidos em gaiolas residência (41 cm × 34 cm × 16 cm) em grupos de 15 por caixa e foram divididos randomicamente em 8 animais por grupo experimental. Todos os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina e mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica da mesma.

Para a investigação do efeito do AA no modelo de mania induzido por m-AMPH foram utilizados ratos Wistar machos pesando entre 250 e 300 gramas e com 2 meses de idade. Os animais foram colocados em gaiolas de residência (41 cm × 34 cm × 16 cm) em grupos de 5 por caixa e divididos randomicamente em grupos de 6 a 12 animais para a realização dos experimentos. Todos os animais foram fornecidos e mantidos no Biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense.

Em ambos os protocolos experimentais, os animais foram mantidos a uma temperatura ambiente de $22 \pm 1^\circ\text{C}$, com acesso livre a água e comida e em um ciclo claro/escuro 12:12h (com as luzes acendendo às 07:00). Todos os procedimentos estavam de acordo com as recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e com aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) das respectivas Universidades (nº protocolo P00795 – UFSC e 11/2014 – UNESC).

4.2 DROGAS

Para a investigação do envolvimento do sistema opióide no efeito tipo-antidepressivo do AA foram utilizados os seguintes compostos: AA (Sigma Aldrich®), naloxona (antagonista não seletivo de receptores opióides, Sigma Aldrich®) e naloxonazina (antagonista de receptores μ -opióides, Tocris Bioscience). O AA foi dissolvido em água destilada e administrado oralmente, num volume de 10 ml/kg. A naloxona e a naloxonazina foram diluídas em salina (NaCl 0,9%) e administradas intraperitonealmente, a um volume de 10 ml/kg, todas as soluções foram preparadas imediatamente antes do início do tratamento.

Para a investigação da ação estabilizadora de humor do AA foram utilizados os seguintes compostos: AA (0,1; 1; 10; 100 mg/kg, Sigma

Aldrich®), LiCl (Sigma Aldrich®) e m-AMPH (Sigma Aldrich®). O AA e o LiCl foram administrados por via oral, e a m-AMPH foi administrada por via intraperitoneal, todos em um volume de 1 ml/kg. O veículo para os compostos administrados por via oral foi água destilada e para os compostos administrados via intraperitoneal foi solução salina (NaCl 0,9%), as soluções foram preparadas frescas durante todos os dias de tratamento.

4.3 INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO ANTIDEPRESSIVA DO AA

Para a investigação do envolvimento do sistema opióide no efeito tipo-antidepressivo do AA os animais foram tratados com AA (1 mg/kg, p.o.), 30 minutos depois foi administrada a naloxona (1 mg/kg, i.p.), e, após 30 minutos, os animais foram submetidos à análise comportamental no TSC e no TCA, como mostra a Figura 3.

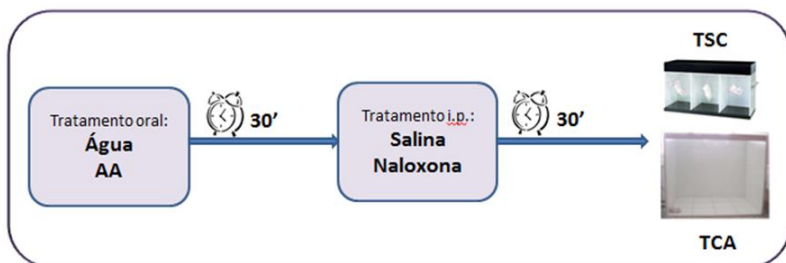


Figura 3. Protocolo experimental 1. Foi investigado o efeito da administração conjunta de AA com um antagonista não seletivo de receptores opióides, a naloxona. O AA (1 mg/kg) foi administrado oralmente e, após 30 minutos, foi administrado naloxona (1 mg/kg) via i.p., e, após 30 minutos, os animais foram testados no TSC e TCA.

Para a investigação do envolvimento específico dos receptores μ 1-opiídeos, os animais foram tratados com AA (1 mg/kg, p.o.), após 30 minutos foi administrada naloxonazina (10 mg/kg, i.p.). Decorridos 30 minutos, os animais foram submetidos aos testes comportamentais citados acima. Ao final dos testes, esses grupos de animais foram decapitados, tiveram hipocampo e córtex pré-frontal dissecados em gelo, congelados rapidamente em nitrogênio líquido e armazenados à temperatura de -80°C para posterior análise bioquímica, como mostra a Figura 4.

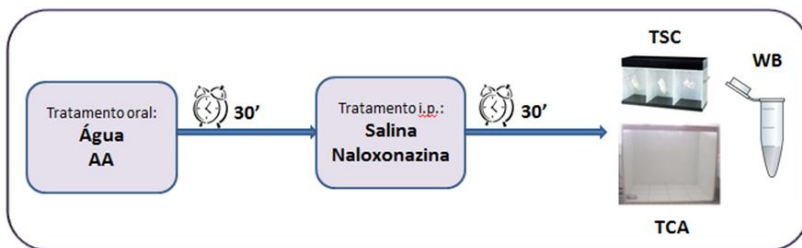


Figura 4. Protocolo experimental 2. Foi investigado o efeito da administração conjunta de AA e naloxonazina, um antagonista opióide seletivo para receptores do tipo $\mu 1$. O AA (1 mg/kg) foi administrado via oral, após 30 minutos foi administrada naloxonazina (10 mg/kg), e, após 30 minutos, os animais foram submetidos aos testes comportamentais e tiveram seus hipocampus e córtex pré-frontal dissecados e preparados para imunodeteção de proteínas através de Western Blot (WB).

4.4 INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DO AA EM MODELO ANIMAL DE MANIA

No modelo de mania induzida por m-AMPH, os ratos receberam duas administrações diárias de AA (0,1; 1; 10 e 100 mg/kg, p.o.), LiCl (45 mg/kg p.o.), escolhida a partir de Brocardo *et al.* (2010), ou água destilada (1ml/kg) por 14 dias. A partir do oitavo dia de tratamento foi adicionada uma dose diária, intraperitoneal, de m-AMPH (2 mg/kg) ou salina (1ml/kg) por 7 dias consecutivos, totalizando 12 grupos experimentais. No 15º dia de tratamento foi realizada uma única injeção de m-AMPH ou salina, e, 2 horas após, a atividade locomotora desses animais foi avaliada no TCA. Após o teste, os animais foram decapitados e os seus hipocampus e córtex pré-frontal foram manualmente dissecados em gelo, congelados rapidamente em nitrogênio líquido e armazenados à -80°C para posterior análise bioquímica, como mostra a Figura 5.

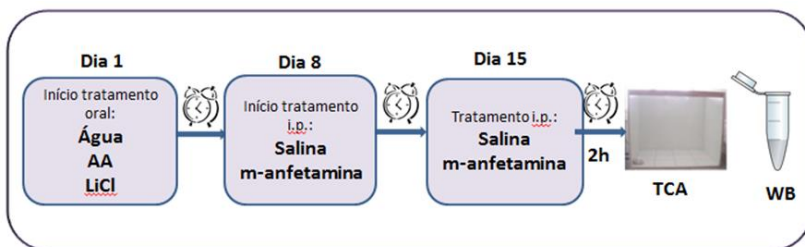


Figura 5. Protocolo experimental 3. Foi investigado o efeito do AA no modelo de prevenção de mania induzida por m-AMPH. A partir do primeiro dia de tratamento os animais receberam duas administrações diárias de AA (0,1; 1; 10; 100 mg/kg), LiCl (45 mg/kg) ou água destilada (1ml/kg) por via oral, por 14 dias. A partir do oitavo dia de tratamento foi adicionada uma injeção diária de m-AMPH (2mg/kg) ou salina (1ml/kg), por 7 dias. No décimo quinto dia foi realizada uma única injeção de m-AMPH e, 2 horas após, os animais foram testados no TCA e tiveram seus hipocampus e córtex pré-frontal dissecados para análise do imunconteúdo de proteínas através de Western Blot (WB).

4.5 AVALIAÇÕES COMPORTAMENTAIS

4.5.1 TSC

O TSC é conhecido como um teste preditivo para a ação tipo-antidepressiva de um composto, visto que antidepressivos clássicos diminuem o tempo de imobilidade dos animais nesse teste (Steru *et al.*, 1985; Cryan *et al.*, 2005).

Durante o teste, os animais são acústica e visualmente isolados e suspensos a 50 cm do chão por 6 minutos, enquanto o tempo em que passam imóveis é cronometrado, segundo o método de Steru *et al.* (1985).

4.5.2 TCA

O TCA consiste em uma caixa de madeira medindo 40x60x50 cm, com a base dividida em 12 quadrados iguais. Durante 6 minutos (camundongos) ou 5 minutos (ratos), o número de quadrados cruzados com as quatro patas é contabilizado, parâmetro utilizado para avaliar a atividade locomotora. A base da caixa de madeira foi limpa com álcool 10% entre os testes, sendo esses realizados em uma sala com temperatura e luz controladas.

Para o estudo relacionado com o efeito tipo-antidepressivo do AA, o TCA é utilizado como uma maneira de descartar a possibilidade

de um aumento na locomoção dos animais ter causado a diminuição no tempo de imobilidade no TSC. Vale ressaltar que antidepressivos clássicos são capazes de diminuir o tempo de imobilidade no TSC sem causar alteração locomotora no TCA (Moretti *et al.*, 2012a).

Para o estudo relacionado com a potencial ação estabilizadora de humor do AA, o TCA é utilizado como teste preditivo dessa ação em ratos. O modelo de indução de mania por m-AMPH tem a capacidade de aumentar a atividade locomotora dos animais no TCA e drogas estabilizadoras de humor, como o LiCl, são capazes de reverter esse aumento na locomoção (Frey *et al.*, 2006). Nesse protocolo, além do número de cruzamentos, é medido também o número total de levantamentos, movimento no qual o animal se apoia apenas nas patas traseiras e levanta o corpo verticalmente, outra medida alterada pelo modelo.

4.6 AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS – IMUNODETECÇÃO DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT

Em ambos protocolos foram extraídos hipocampo e córtex pré-frontal para imunodeteção de proteínas através de Western Blot, realizado conforme descrito previamente (Leal *et al.*, 2002; Cordova *et al.*, 2004). As amostras foram preparadas segundo Oliveira *et al.* (2008). Os tecidos foram homogeneizados mecanicamente em 300 μ L de tampão de homogeneização (Tris 50 mM pH 7,0, EDTA 1 mM, fluoreto de sódio 100 mM, PMSF 0,1 mM, Na₃VO₄ 2 mM, Triton X-100 1%, glicerol 10% e coquetel inibidor de proteases). Os lisados foram centrifugados (10.000 x g por 10 min, a 4°C) para a eliminação de debris celulares, e o sobrenadante (200 μ L) diluído 1/1 (v/v) em solução (Tris 100 mM pH 6,8, EDTA 4mM, SDS 8%) e aquecidos a 100°C por 5 min. Após homogeneização, uma alíquota foi retirada para a dosagem de proteínas. Em seguida adicionou-se numa proporção de 25:100 (v/v) a solução de diluição de amostra (glicerol 40%, Tris 25mM e azul de bromofenol, pH 6,8) e adição de β -mercaptoetanol 8%.

O teor proteico foi estimado através do método descrito por Peterson (1977) e a concentração proteica estimada a partir de uma curva padrão de albumina de soro bovino. As proteínas (60 μ g de proteína total/poço) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (concentrações de 10 ou 12% de acrilamida dependendo da proteína de interesse) contendo SDS (SDS-PAGE) e gel de entrada com 4% de acrilamida. A seguir, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose. Para verificar a eficiência do processo de

transferência as membranas foram coradas com Ponceau 0,5% em ácido acético 1%.

Após esse processo, as membranas foram bloqueadas durante 1 hora com leite em pó desnatado 5% TBS (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5). O imunoconteúdo de PSD95, FGF-2 e BDNF foi detectado com o uso de anticorpos específicos diluídos em TBS-T contendo albumina de soro bovino (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tween- 20 0,05%, BSA 2%, pH 7,5) na diluição 1:1000, exceto BDNF que foi utilizada a diluição de 1:250. As membranas foram incubadas com o anticorpo de interesse overnight a 4°C em agitação constante. No dia seguinte, para a detecção dos complexos imunes, as membranas foram incubadas por 1 hora com anticorpo secundário anti-coelho conjugado com peroxidase (1:5000) e a imunorreatividade das bandas foi revelada por quimioluminescência com o reagente Amersham ECL Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare Life Sciences) segundo especificações do fabricante e com o uso do equipamento de revelação Chemidoc® (Bio-Rad 79 Laboratories). Todas as etapas de bloqueio e incubação foram seguidas por três lavagens (5 minutos cada) das membranas com TBS-T. As membranas foram incubadas com o anticorpo anti- β -actina (1:1000) para verificar se a mesma quantidade de proteínas teriam sido aplicadas no gel. A fim de se detectarem os níveis de BDNF e FGF-2 na mesma membrana, os imunocomplexos foram removidos conforme descrito previamente por (Posser *et al.*, 2007). De forma simplificada, as membranas foram lavadas uma vez com água duplamente deionizada (5 minutos), em seguida foram incubadas com NaOH 0,2 M (5 minutos), lavadas com água duplamente deionizada (5 minutos) e por último com TBS-T (5 minutos). As membranas desprovidas de imunocomplexos foram bloqueadas e submetidas ao mesmo protocolo descrito acima.

A densidade óptica (DO) foi calculada através do Image Lab software® 4.1 (Bio-Rad Laboratories). Os imunoconteúdos das proteínas de interesse foram determinados pela relação entre a DO dessas proteínas / DO da β -actina respectiva. Os dados foram expressos como porcentagem em relação ao controle (considerado como 100%).

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Tanto para os parâmetros comportamentais quanto para os bioquímicos, os resultados obtidos foram avaliados por análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguido do teste *post-hoc* de Duncan, quando apropriado. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados

significativos. Para os cálculos estatísticos foi usado o programa Statistica 7.0. StatSoft. Inc.®.

5. RESULTADOS

5.1 INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO ANTIDEPRESSIVA DO AA

5.1.1 Envolvimento do sistema opióide na ação tipo-antidepressiva do AA no TSC e na atividade locomotora no TCA

Considerando as evidências que mostram o envolvimento de diversos sistemas de neurotransmissores no efeito tipo-antidepressivo do AA, neste estudo investigamos o envolvimento do sistema opióide no efeito tipo-antidepressivo dessa vitamina. Para isso, no primeiro grupo de experimentos utilizamos um antagonista não seletivo de receptores opióides, naloxona. A Figura 6A mostra o efeito da inibição dos receptores opióides pela naloxona (1 mg/kg, i.p.). A ANOVA de duas vias mostrou diferenças significativas para o tratamento com AA [$F(1,33) = 8.492$; $p < 0.01$], para o tratamento com naloxona [$F(1,33) = 13,454$; $p < 0,01$] e para a interação dos dois tratamentos [$F(1,33) = 16,410$; $p < 0,01$]. A análise *post-hoc* mostra que a administração sistêmica (p.o.) de AA na dose de 1 mg/kg reduziu o tempo de imobilidade dos animais no TSC de forma significativa ($P < 0,01$), enquanto que a administração via i.p. de naloxona preveniu essa diminuição. A análise da atividade locomotora não demonstrou alterações significativas no número de cruzamentos dos animais no TCA em nenhum dos grupos (tratamento com AA [$F(1,33) = 0,7002$; $p > 0,05$], tratamento com naloxona [$F(1,33) = 1,4710$; $p > 0,05$], interação dos dois tratamentos [$F(1,33) = 0,1740$; $p > 0,05$]), como pode ser observado na Figura 6B.

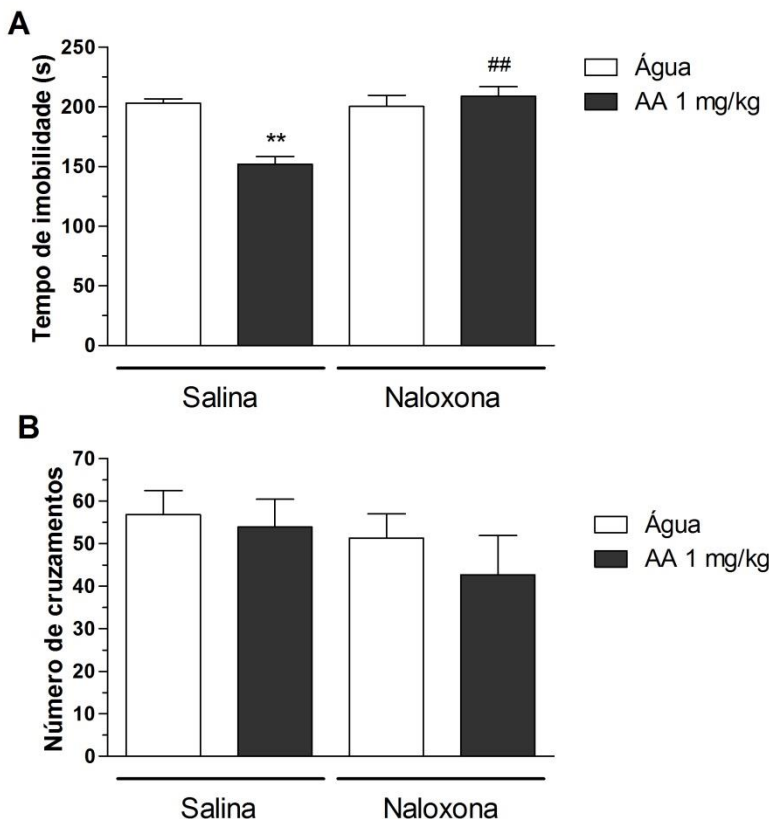


Figura 6. Efeito do pré-tratamento com naloxona (1 mg/kg, i.p.) no efeito anti-imobilidade do AA no TSC (painel A) e na locomoção no TCA (painel B). Os valores estão expressos como média + E.P.M. (N=9-10). ** $P < 0,01$ quando comparado aos animais tratados com veículo. ## $P < 0,001$ quando comparado aos animais tratados com AA. Os resultados foram analisados por ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post-hoc* de Duncan.

5.1.2 Envolvimento dos receptores opióides do tipo μ_1 no efeito tipo-antidepressivo do AA no TSC e a atividade locomotora no TCA

Aprofundando um pouco nosso conhecimento, em outro grupo de experimentos utilizamos um antagonista de receptores opióides seletivo para o tipo μ_1 , naloxonazina. A Figura 7A mostra o efeito da inibição dos receptores μ_1 opióides pela naloxonazina, a ANOVA de duas vias

revelou diferenças significativas para o tratamento com naloxonazina [$F(1,28) = 14,322$; $p < 0,01$] e para a interação do tratamento com AA com o tratamento com naloxonazina [$F(1,28) = 11,063$; $p < 0,01$], mas não para o tratamento com AA [$F(1,28) = 1,819$; $p > 0,05$]. A análise *post-hoc* mostrou que a administração sistêmica (p.o.) de AA na dose de 1 mg/kg reduziu o tempo de imobilidade dos animais no TSC de forma significativa ($P < 0,01$), enquanto que a administração i.p. de naloxonazina foi capaz de prevenir significativamente esse efeito. A análise da atividade locomotora não demonstrou alterações significativas no número de cruzamentos dos animais no TCA em nenhum dos grupos (tratamento com AA [$F(1,26) = 0,1175$; $p > 0,05$], tratamento com naloxonazina [$F(1,26) = 3,2918$; $p > 0,05$], interação dos dois tratamentos [$F(1,26) = 1,0923$; $p > 0,05$]) (Figura 7B).

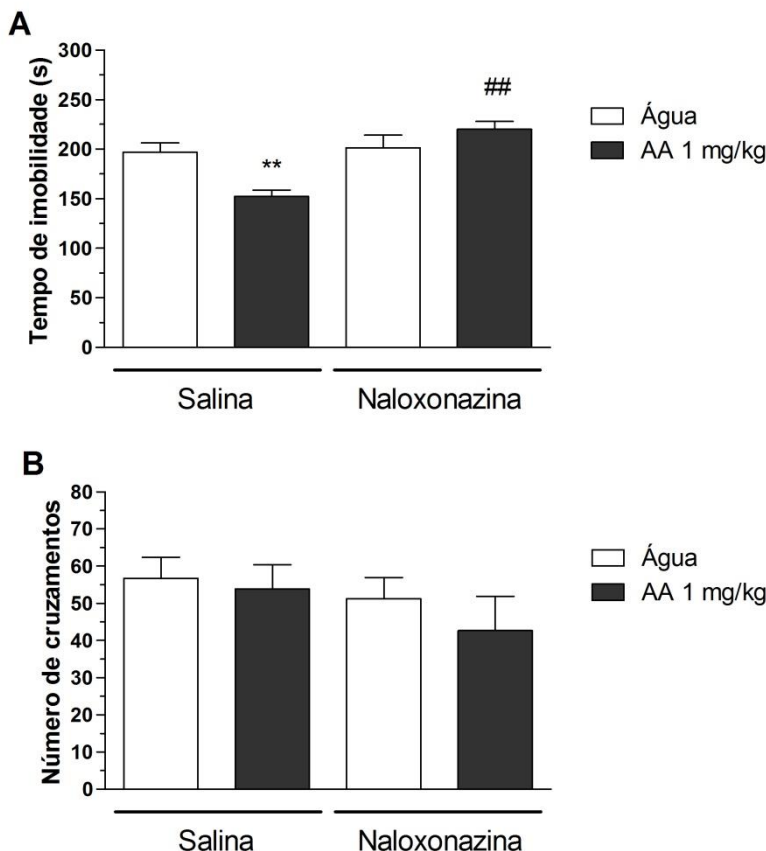


Figura 7. Efeito do pré-tratamento dos animais com naloxonazina (10 mg/kg, i.p.) no efeito anti-imobilidade do AA no TSC (Painel A) e na atividade locomotora no TCA (painel B). Os valores estão expressos como média + E.P.M. (N=8). ** $P < 0,01$ quando comparado aos animais tratados com veículo. ## $P < 0,001$ quando comparado aos animais tratados com AA. Os resultados foram analisados por ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post-hoc* de Duncan.

5.1.3 Envolvimento da proteína sináptica PSD95 no efeito inibitório da naloxonazina sobre a ação tipo-antidepressiva do AA

Os resultados apresentados na Figura 8 mostram o imunoconteúdo da proteína PSD95 no hipocampo (painel A) e córtex

pré-frontal (painel B) dos animais injetados com naloxonazina (10 mg/kg, i.p.) e pré-tratados com AA (1 mg/kg, p.o.) utilizando a técnica de western blot. A ANOVA de duas vias não revelou alterações significativas em nenhum dos tratamentos, tanto no hipocampo (tratamento com AA [$F(1,23) = 0,9708$; $p > 0,05$], tratamento com naloxonazina [$F(1,23) = 2,3627$; $p > 0,05$], interação dos dois tratamentos [$F(1,23) = 0,4245$; $p > 0,05$]) (Figura 8A), quanto no córtex pré-frontal (tratamento com AA [$F(1,16) = 0,22169$; $p > 0,05$], tratamento com naloxonazina [$F(1,16) = 1,01055$; $p > 0,05$], interação dos dois tratamentos [$F(1,16) = 0,00920$; $p > 0,05$]) (Figura 8B) dos animais.

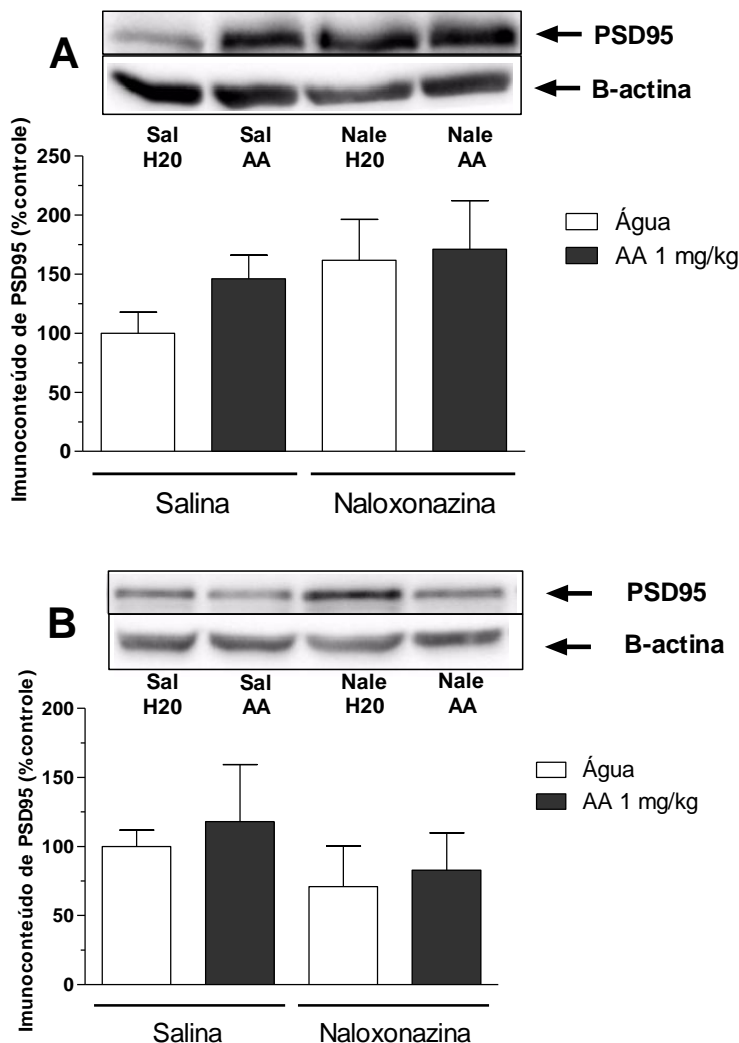


Figura 8. Efeito do tratamento com naloxonazina (10 mg/kg, i.p.) e/ou AA sobre o imunoproteína de PSD95 no hipocampo (painel A) e córtex pré-frontal (painel B) de camundongos. Os valores estão expressos como média + E.P.M. (N=6-8, hipocampo; N=4-6 córtex). Os resultados foram analisados por ANOVA de duas vias.

5.2 INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DO AA NO MODELO DE MANIA INDUZIDO POR m-AMPH

5.2.1 Efeito da administração repetida de AA no modelo de mania induzida por m-AMPH sobre a locomoção e o número de levantamentos dos animais no TCA

Considerando as evidências encontradas na literatura que apontam para um possível efeito antimaníaco do AA, na segunda etapa deste trabalho estudamos o efeito do AA em um modelo animal de mania induzida por m-AMPH. A Figura 9 mostra o efeito da administração repetida (14 dias) de LiCl neste modelo, sobre o número de cruzamentos (painel A) dos animais no TCA. A ANOVA de duas vias revelou diferenças significativas para o tratamento com m-AMPH [$F(1,28) = 59,2497$; $p < 0,01$], para o tratamento com LiCl [$F(1,28) = 13,4136$; $p < 0,01$] e para a interação do tratamento com m-AMPH e o tratamento com LiCl [$F(1,28) = 6,2427$; $p < 0,05$]. A análise *post-hoc* mostrou que a administração repetida de LiCl por 14 dias foi capaz de prevenir o aumento no número de cruzamentos ($p < 0,01$) causada pela administração repetida com m-AMPH por 7 dias ($p < 0,01$). A Figura 9B mostra a administração repetida (14 dias) de LiCl, sobre o número de levantamentos dos animais no TCA. A ANOVA de duas vias revelou diferenças significativas para o tratamento com m-AMPH [$F(1,28) = 47,9723$; $p < 0,01$], para o tratamento com LiCl [$F(1,28) = 10,6984$; $p < 0,01$] e para a interação do tratamento com m-AMPH e o tratamento com LiCl [$F(1,28) = 5,1707$; $p < 0,05$]. A análise *post-hoc* mostrou que a administração repetida de LiCl por 14 dias foi capaz de prevenir o aumento no número de levantamentos ($p < 0,01$) causada pela administração repetida com m-AMPH por 7 dias ($p < 0,01$).

A Figura 10 mostra o efeito da administração repetida de AA por 14 dias no modelo de mania induzido por m-AMPH, sobre o número de cruzamentos (painel A) dos animais no TCA. A ANOVA de duas vias revelou diferenças significativas para o tratamento com m-AMPH [$F(1,85) = 73,1460$; $p < 0,01$], mas não para o tratamento com AA [$F(4,85) = 0,7664$; $p > 0,05$] ou para a interação dos dois tratamentos [$F(4,85) = 2,2427$; $p > 0,05$]. O painel B mostra o efeito da administração repetida de AA por 14 dias no modelo de mania induzida por m-AMPH sobre o número de levantamentos dos animais no TCA, a ANOVA de duas vias revelou diferenças significativas para o tratamento com m-AMPH [$F(1,87) = 77,5962$; $p < 0,01$] e para interação do tratamento com m-AMPH e o tratamento com AA [$F(4,87) = 4,7304$; $p < 0,01$], mas não

para o tratamento com AA [$F(4,87) = 0,4293$; $p > 0,05$]. A análise *post-hoc* mostrou que a administração repetida de m-AMPH ($p < 0,01$) aumentou o número de cruzamentos dos animais no teste e o tratamento com AA não foi capaz de reverter esse efeito.

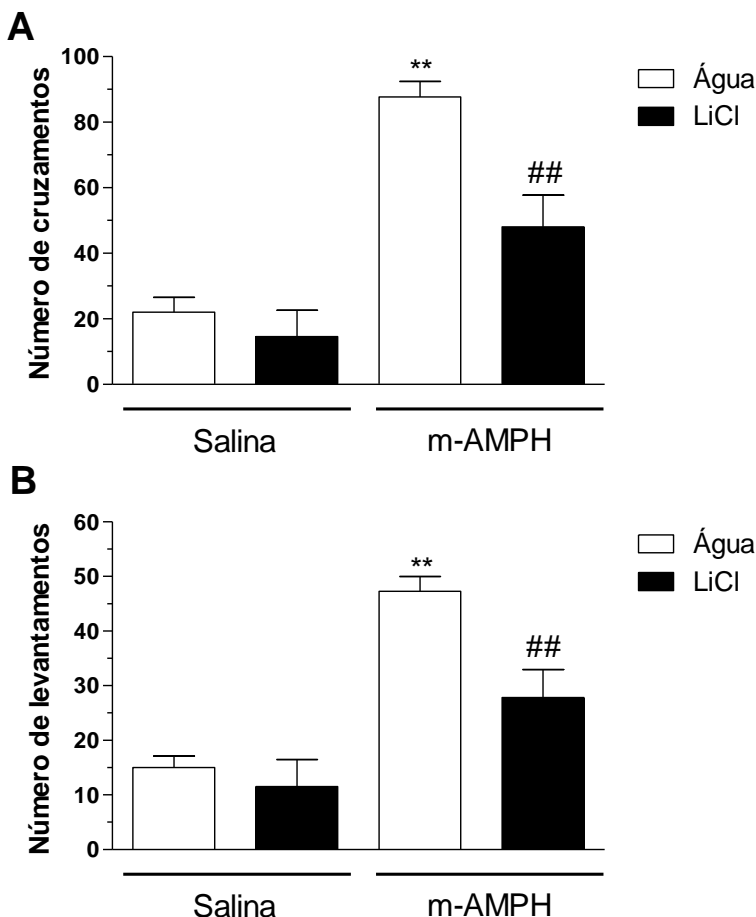


Figura 9. Efeito do LiCl no modelo de mania induzida por m-AMPH sobre a número de cruzamentos (painel A) e de levantamentos (painel B) dos animais no TCA. Os valores estão expressos como média + E.P.M. (N=6-10). ** $P < 0,01$ quando comparado aos animais tratados com veículo. ## $P < 0,01$ quando comparado aos animais tratados com m-AMPH. Os resultados foram analisados por ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post-hoc* de Duncan.

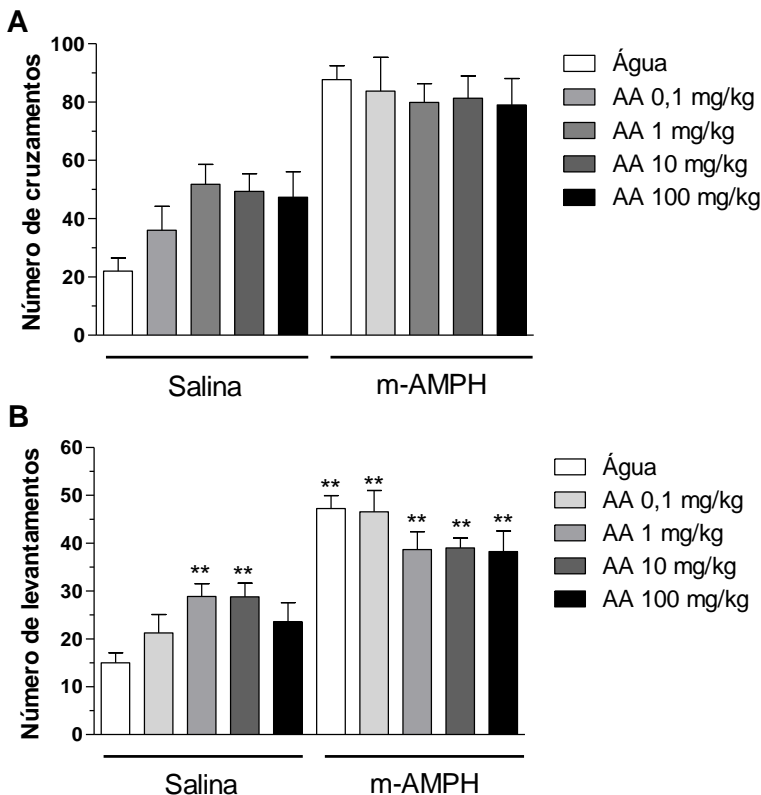


Figura 10. Efeito do AA no modelo de mania induzida por m-AMPH sobre a número de cruzamentos (painel A) e de levantamentos (painel B) dos animais no TCA. Os valores estão expressos como média + E.P.M. (N=8-11). ** $P < 0,01$ quando comparado aos animais tratados com veículo. Os resultados foram analisados por ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post-hoc* de Duncan.

5.2.2 Influência do modelo de mania induzida por m-AMPH sobre o imunoconteúdo hipocampal e cortical de BDNF em ratos tratados ou não com LiCl ou AA

Os resultados apresentados na Figura 11 mostram o imunoconteúdo do fator neurotrófico BDNF no hipocampo (painel A) e córtex pré-frontal (painel B) dos animais submetidos ao protocolo de mania induzida por m-AMPH utilizando a técnica de western blot. A

análise por densitometria seguida de ANOVA de duas vias revela diferenças significativas para o tratamento com m-AMPH [$F(1,30) = 10,1388$; $p < 0,01$], mas não para o tratamento com AA ou LiCl [$F(2,30) = 0,1049$; $p > 0,05$] nem para a interação dos tratamentos [$F(2,30) = 0,1424$; $p > 0,05$] no hipocampo dos animais (painel A). No córtex pré-frontal a ANOVA de duas vias mostrou diferenças significativas para o tratamento com m-AMPH [$F(1,21) = 5,0480$; $p < 0,05$] e para a interação do tratamento com m-AMPH e o tratamento com AA ou LiCl [$F(2,21) = 3,6491$; $p < 0,05$], mas não para o tratamento com AA ou LiCl [$F(2,21) = 0,3433$; $p > 0,05$].

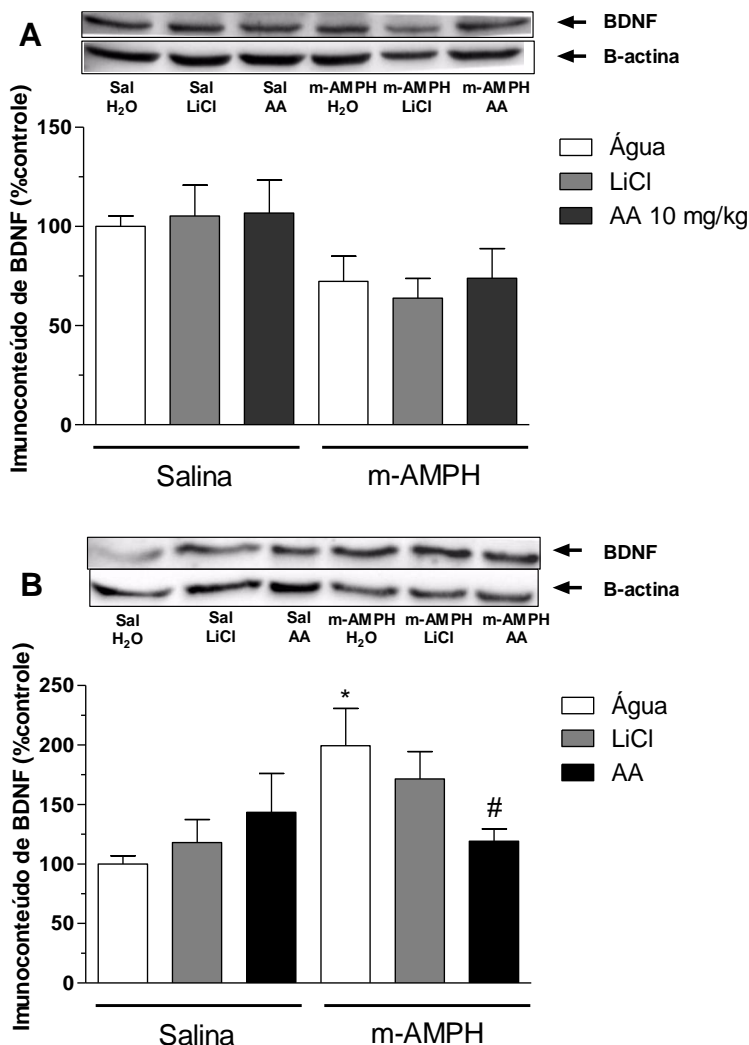


Figura 11. Efeito do pré-tratamento dos animais com AA ou LiCl no modelo de mania induzido por m-AMPH no imunocounteúdo de BDNF no hipocampo (painel A) e córtex pré-frontal (painel B) de ratos. Os valores estão expressos como média + E.P.M. (N=4-6). Os resultados foram analisados por ANOVA de duas vias seguida por *post hoc* de Duncan. * $P < 0,05$ comparado aos animais tratados com veículo. # $P < 0,05$ comparado aos animais tratados com m-AMPH.

5.2.3 Influência do modelo de mania induzida por m-AMPH sobre o imunoconteúdo hipocampal e cortical de FGF-2 em ratos tratados ou não com LiCl ou AA

Os resultados apresentados na Figura 12 mostram o imunoconteúdo do fator de crescimento FGF-2 no hipocampo (painel A) e córtex pré-frontal (painel B) dos animais submetidos ao protocolo de mania induzida por m-AMPH utilizando a técnica de western blot. A análise por densitometria seguida de ANOVA de duas vias não revelou nenhuma diferença estatística em nenhum dos grupos (tratamento com m-AMPH [$F(1,30) = 0,5049$; $p > 0,05$], tratamento com AA ou LiCl [$F(2,30) = 0,0313$; $p > 0,05$], interação dos tratamentos [$F(2,30) = 0,8020$; $p > 0,05$]) no hipocampo dos animais. No córtex pré-frontal a ANOVA de duas vias detectou diferenças significativas no tratamento com m-AMPH [$F(1,12) = 10,9753$; $p < 0,01$], mas não no tratamento com AA ou LiCl [$F(2,12) = 0,2163$; $p > 0,05$] ou na interação dos dois tratamentos [$F(2,12) = 0,2880$; $p > 0,05$].

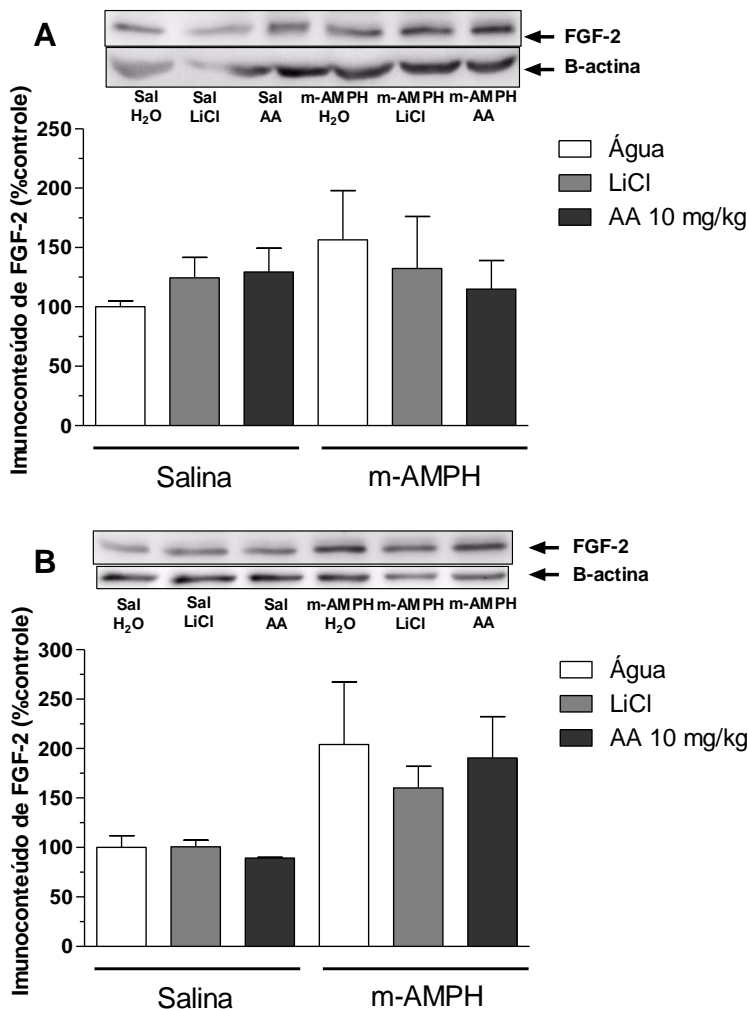


Figura 12. Efeito do pré-tratamento dos animais com AA ou LiCl no modelo de mania induzido por m-AMPH no imunocounteúdo de FGF-2 no hipocampo (painel A) e córtex pré-frontal (painel B) de ratos. Os valores estão expressos como média + E.P.M. (N=3-6). Os resultados foram analisados por ANOVA de duas vias.

6. DISCUSSÃO

Os transtornos de humor abrangem um amplo espectro de distúrbios que têm como principais representantes a depressão maior e o THB. Ambos são muito custosos para a sociedade e as alterações neuroquímicas responsáveis por estes transtornos ainda não são completamente compreendidas (Nestler e Carlezon, 2006).

No que diz respeito à depressão maior, até os anos 50 o ópio era o principal tratamento farmacológico para melancolia (Eurich, 2015), desde então o sistema opióide tem sido muito implicado na fisiopatologia da depressão, principalmente quanto a sua participação na recuperação de pacientes com depressão refratária. Schreiber e colaboradores (2002) especulam que, nesses casos, seja necessário o uso de antidepressivos, como venlafazina e mirtazapina, que envolvem a ativação do sistema opióide em seu mecanismo de ação.

O efeito antidepressivo do AA tem sido investigado através de diferentes perspectivas. Estudos clínicos demonstram uma diminuição dos níveis plasmáticos e séricos de AA em pacientes com depressão, com ou sem tratamento farmacológico convencional (Khanzode *et al.*, 2003; Gautam *et al.*, 2012), e que a suplementação com AA é capaz de reduzir os sintomas depressivos (Gautam *et al.*, 2012). Além disso, a suplementação com AA concomitante com o tratamento com fluoxetina levou a superior melhora dos sintomas de depressão quando comparado ao tratamento apenas com fluoxetina (Amr *et al.*, 2013). Em uma abordagem pré-clínica, nosso grupo já caracterizou o efeito tipo-antidepressivo do AA em modelos animais de depressão como estresse de contenção (Moretti *et al.*, 2013) e estresse crônico imprevisível (Moretti *et al.*, 2012a), além de já ter sido evidenciado que o AA promove efeito tipo-antidepressivo no TSC, teste preditivo de atividade antidepressiva (Binfaré *et al.*, 2009; Moretti *et al.*, 2011). Essas evidências apontam para a importância de se compreender melhor quais os mecanismos envolvidos na ação antidepressiva do AA.

Com o intuito de verificar se o AA poderia promover um efeito antidepressivo dependente da ativação do sistema opióide, o primeiro conjunto de experimentos deste trabalho utilizou um antagonista não seletivo de receptores opióides, a naloxona, a fim de verificar a influência da sua administração sobre o efeito do AA no TSC. O AA em dose de 1 mg/kg administrado por via oral diminuiu o tempo de imobilidade dos animais no TSC, confirmando dados prévios do nosso grupo (Binfaré *et al.*, 2009; Moretti *et al.*, 2011). O tratamento com naloxona preveniu esse efeito tipo-antidepressivo do AA, indicando que

o mesmo envolve a ativação de receptores opióides. Dados semelhantes foram encontrados em experimentos com outros compostos estudados em nosso grupo, como agmatina, adenosina e ácido fólico (Zomkowski *et al.*, 2005; Kaster *et al.*, 2007; Brocardo *et al.*, 2009). Vale ressaltar que apesar do TSC ser um teste que possa sofrer influência de compostos que alteram a atividade locomotora dos animais, este não foi o caso, pois nenhum dos grupos experimentais apresentou alteração na atividade locomotora no TCA.

Dentre os diferentes tipos de receptores opióides, podemos destacar a importância da modulação dos receptores μ na fisiopatologia da depressão, uma vez que agonistas μ -opióides, como oxicodona e oximorfona, apresentam propriedades antidepressivas em pacientes com depressão refratária (Stoll e Rueter, 1999), além desse subtipo de receptores se encontrar ativado durante a aceitação de um episódio de rejeição (Hsu *et al.*, 2015). Adicionalmente, o tramadol, um analgésico que é ligante de receptores μ opióides produz um efeito tipo-antidepressivo no TNF, um teste preditivo de ação antidepressiva (Roja-Corrales *et al.*, 1998, 2002). Sendo assim, para verificar se o efeito tipo-antidepressivo do AA no TSC é dependente da ativação de receptores μ 1 opióides, em uma segunda etapa de experimentos foi utilizado um antagonista irreversível de receptores μ 1-opiídes, a naloxonazina. Como no experimento anterior, o AA na dose de 1 mg/kg diminuiu o tempo de imobilidade dos camundongos no TSC, e a administração de naloxonazina preveniu esse efeito, sendo que nenhum dos grupos experimentais apresentou alteração locomotora no TCA. Esses resultados indicam que o efeito tipo-antidepressivo do AA nesse modelo envolve, pelo menos em parte, a ativação de receptores opióides do tipo μ 1.

O efeito do AA sobre o sistema opióide pode se dar de forma indireta, devido a uma interação entre receptores NMDA e o sistema opióide, hipótese sustentada por evidências de que o AA é capaz de inibir esse tipo de receptor (Moretti *et al.*, 2011) e o fato da inibição de receptores NMDA estar associada com a liberação de opióides endógenos (Maze e Fujinaga, 2000), interação similar a encontrada em experimentos utilizando ácido fólico, outro composto estudado por nosso grupo (Brocardo *et al.*, 2009). Esses dados sugerem que um bloqueio de receptores NMDA por parte do AA pode ter aumentado os níveis de opióides endógenos e esses estariam ativando os receptores opióides, em especial os do tipo μ 1, como pôde ser observado neste trabalho. Apesar dessas evidências, a hipótese de uma ligação direta do

AA aos receptores opióides, principalmente do subtipo $\mu 1$, não pode ser descartada neste momento.

Estudos futuros deverão ser realizados no sentido de investigar a possibilidade do efeito tipo-antidepressivo do AA no TSC ser potencializado por um agonista opióide, como a morfina. Estudos prévios mostram que esse agonista opióide não seletivo exerce ação tipo-antidepressiva no TSC e TNF (Eschalier *et al.*, 1987; Zomkowski *et al.*, 2005), além de apresentar sinergismo com outros compostos com ação antidepressiva (Kaster *et al.*, 2007; Brocardo *et al.*, 2009). Após a realização de um estudo dessa natureza, teremos mais subsídios sobre a implicação do sistema opióide no efeito tipo-antidepressivo do AA.

Estudos recentes tem chamado atenção para a importância de se aprofundar os estudos com relação à sinalização decorrente da ativação da via mTOR, principalmente após a descoberta de que a cetamina tem sua rápida ação antidepressiva através da ativação dessa via (Duman *et al.*, 2012). Um estudo mostrou que a ativação de receptores μ -opióides foi capaz de atenuar o dano neurotóxico induzido por oligômeros de A β em cultura de neurônios corticais através da sinalização por mTOR (Wang *et al.*, 2015), além disso, a administração de tramadol, um analgésico que tem seus efeitos através de ativação de receptores opióides, foi capaz de elevar os efeitos tipo-antidepressivos da cetamina, através do aumento na fosforilação de mTOR (Yang *et al.*, 2012).

Moretti e colaboradores (2014) demonstraram que o a ativação da via da mTOR é necessária para o efeito tipo-antidepressivo do AA. Considerando que a proteína sináptica PSD95 é um alvo dependente da ativação de mTOR, nós investigamos o envolvimento dessa proteína no efeito tipo-antidepressivo do AA e sua interação com o sistema opióide, em homogenatos de hipocampo e córtex pré-frontal de camundongos. Apesar de nossos resultados não demonstrarem alterações significativas no imunoconteúdo de PSD95, podemos notar um aumento dos níveis dessa proteína em todos os grupos com relação ao controle nas amostras de hipocampo. Acreditamos que a falta de significância estatística possa se dar ao fato de nossos resultados terem tido alta variabilidade, o que ainda será confirmado com novos experimentos futuros. Embora ainda não confirmado, o AA parece ser capaz de aumentar o imunoconteúdo de PSD95 no hipocampo dos animais, o que estaria de acordo com um trabalho prévio que mostrou a mesma alteração (Moretti *et al.*, 2014). Além disso, aparentemente não há nenhum efeito da administração de naloxonazina sobre esse possível aumento no imunoconteúdo de PSD95 causado pelo AA, isso evidenciaria que o efeito da naloxonazina no TSC, prevenindo a ação anti-imobilidade do AA, ocorra por um

mecanismo independente da ativação de mTOR e, consequentemente, de PSD95. Sendo assim, a ativação da via mTOR, apesar de estar envolvida no mecanismo tipo-antidepressivo do AA nesse teste (Moretti *et al.*, 2014), aparentemente não está relacionada à ativação do sistema opióide.

Estudos prévios do nosso grupo já demonstraram a participação dos sistemas serotoninérgico, noradrenérgico, dopaminérgico (Binfaré *et al.*, 2009) e glutamatérgico (Moretti *et al.*, 2014), além do envolvimento dos canais de potássio (Moretti *et al.* 2012b) e da modulação de mTOR (Moretti, *et al.*, 2014) no efeito tipo-antidepressivo do AA e, estendendo esse conhecimento, este trabalho demonstra que o efeito tipo-antidepressivo do AA no TSC é dependente também da ativação do sistema opióide.

No que diz respeito ao THB, pouco se sabe sobre os efeitos do AA, principalmente na fase maníaca da doença. Estudos mais antigos demonstraram que o AA pode agir sobre o sistema dopaminérgico. Tolbert e colaboradores (1979) mostraram que o tratamento com essa vitamina foi capaz de prevenir o comportamento circulatório observado em ratos que receberam uma injeção de anfetamina após terem sofrido uma lesão unilateral na região nigro-estriatal, um modelo usado para investigar compostos que tenham ação sobre o sistema dopaminérgico. Além disso, foi demonstrado que o pré-tratamento com AA atenuou fortemente a hiperlocomoção induzida pela administração de anfetamina em camundongos (Heikkila *et al.*, 1981). Mais recentemente, um trabalho do nosso grupo demonstrou que o efeito tipo-antidepressivo do AA no TSC é dependente da ativação do sistema dopaminérgico (Binfaré *et al.*, 2009). Em conjunto, esses dados sugerem que o AA possa ter um efeito modulatório sobre o sistema dopaminérgico, o que seria de grande valia para o tratamento do THB, uma vez que essa doença possui um padrão de variação nos níveis desse neurotransmissor durante as diferentes fases da doença.

Com base nessas evidências, a segunda parte deste trabalho focou em investigar o possível efeito antimaníaco do AA em um modelo animal. Para tanto, utilizou-se um modelo no qual o tratamento repetido (7 dias) com m-AMPH induz um efeito hiperlocomotor em ratos, que pode ser avaliado tanto pelo número de cruzamentos quanto pelo número de levantamentos dos ratos durante o TCA (Frey *et al.*, 2006). Nossos resultados mostram que o modelo foi replicado, visto que o grupo tratado com m-AMPH teve um aumento significativo nos dois parâmetros avaliados. Além disso, foi demonstrado que o pré-tratamento com LiCl durante 7 dias e o tratamento concomitante com m-AMPH

durante 7 dias, utilizado como controle positivo, foi capaz de prevenir esse efeito hiperlocomotor, como já havia sido evidenciado em estudos prévios da literatura (Frey *et al.*, 2006; Andreazza *et al.*, 2008; Cechinel-Recco *et al.*, 2012). No entanto, o AA administrado por via oral nas doses de 0,1; 1; 10 e 100 mg/kg, não foi efetivo em prevenir essas alterações comportamentais. Cabe ressaltar que o AA administrado em doses mais baixas (0,1; 1 e 10 mg/kg, p.o.) é efetivo em produzir efeito tipo-antidepressivo (Binfaré *et al.*, 2009).

Considerando a importância das neurotrofinas na fisiopatologia do THB, investigamos também o envolvimento de BDNF e FGF-2 no modelo de mania induzido por m-AMPH. Estudos demonstram que os níveis séricos e plasmáticos de BDNF estão diminuídos durante as fases maníaca e depressiva, enquanto que retornam aos níveis basais durante a fase eutímica, e que pacientes clinicamente recuperados apresentam um aumento nos níveis de BDNF (Lin, 2009; Fernandes *et al.*, 2011). Por esta razão, estudos tem proposto a utilização do nível periférico de BDNF como potencial biomarcador para episódios de transtornos de humor, além de preditor da eficácia de tratamentos (Polyakova *et al.*, 2014; Piccinni *et al.*, 2015). Além disso, muitas evidências têm demonstrado o importante papel dos FGF's no sistema nervoso central, desde o seu envolvimento clássico com o desenvolvimento e reparação neuronal, até uma potencial influência no aprendizado e plasticidade neural (Reuss e vonBohlen und Halbach, 2003; Liu *et al.*, 2014). Dentre eles, o FGF-2 tem sido associado com transtornos de humor. Estudos mostram uma diminuição na expressão de transcritos de FGF-2 em pacientes depressivos (Evans *et al.*, 2004), enquanto que os níveis séricos de FGF-2 encontram-se aumentados durante episódios de mania (Liu *et al.*, 2014).

Nossos resultados mostram um efeito principal da m-AMPH sobre o imunoconteúdo de BDNF em homogenatos de hipocampo de ratos. Apesar de nenhum dos grupos apresentarem alteração significativa, todos os grupos tratados com m-AMPH apresentaram uma diminuição de BDNF nessa estrutura encefálica, o que está de acordo com dados da literatura que mostram que pacientes com THB possuem diminuição nos níveis séricos e plasmáticos de BDNF, principalmente durante episódios de mania (Cunha *et al.*, 2006; Machado-Vieira *et al.*, 2007; Fernandes *et al.*, 2011; Piccinni *et al.*, 2015). Além disso, estudos prévios demonstram uma diminuição no imunoconteúdo de BDNF no hipocampo após a administração de d-AMPH em um protocolo similar ao realizado neste trabalho (Frey *et al.*, 2006; Cechinel-Recco *et al.*, 2012).

Nossos resultados mostram ainda que o tratamento com m-AMPH aumentou o imunocontéudo de BDNF no córtex pré-frontal dos animais e o pré-tratamento com AA preveniu essa alteração induzida pela m-AMPH. No entanto, dados da literatura mostram que a utilização de d-AMPH em um modelo similar teve efeito contrário sobre o imunocontéudo de BDNF nesta estrutura encefálica, reduzindo-o (Cechinel-Recco *et al.*, 2012). Apesar dos dois isômeros de anfetamina terem resultados semelhantes sob ponto de vista de alguns parâmetros como, por exemplo, comportamental e sobre o dano oxidativo (da-Rosa *et al.*, 2011), no caso da ativação de BDNF observam-se efeitos opostos por um mecanismo ainda não esclarecido.

Uma hipótese interessante é a que o aumento no imunocontéudo de BDNF no grupo tratado com m-AMPH seja devido a um mecanismo compensatório ao dano causado pelo tratamento. O pré-tratamento com LiCl atenuou este efeito, enquanto que o AA foi efetivo em prevenir este efeito da m-AMPH, possivelmente devido a um efeito neuroprotetor, evitando a necessidade da upregulação de BDNF. Situação similar parece ter acontecido em outro trabalho de nosso grupo, no qual o tratamento repetido com um extrato de *Tabebuia avellanedae* preveniu o aumento no imunocontéudo hipocampal de BDNF após bullectomia olfatória em camundongos (Freitas *et al.*, 2013), além de um mecanismo do mesmo tipo ser o provável responsável pelo aumento no imunocontéudo de Bcl-2 (uma proteína anti-apoptótica) após estresse de contenção em camundongos (Moretti *et al.*, 2013). Adicionalmente, um estudo de Bücker e colaboradores (2014) mostrou um aumento nos níveis plasmáticos de BDNF em crianças que sofreram algum trauma, sugerindo que esse aumento nos níveis BDNF seria uma tentativa de compensar ou neutralizar os efeitos do trauma infantil.

Com relação ao imunocontéudo de FGF-2, nossos resultados mostram um efeito principal da m-AMPH aumentando os níveis dessa neurotrofina em amostras de córtex pré-frontal dos ratos submetidos ao protocolo. Esse dado é compatível com a literatura, que mostra que o FGF-2 é um dos mediadores da melhora motora induzida por anfetamina após acidente vascular cerebral (Wolf *et al.*, 2014). Além disso, uma desregulação de FGF-2 parece estar envolvida no desenvolvimento e função cerebral anormal associados a esse transtorno (Gaughran *et al.*, 2006). Esse resultado vai ao encontro do que Liu e colaboradores (2014) obtiveram ao analisar níveis séricos de FGF-2 em pacientes com episódios maníacos, os quais estariam aumentados, juntamente com os níveis de outras angioneurinas, no esforço para um mecanismo neuroprotetor compensatório após esse tipo de episódio.

Em conjunto, nossos dados estendem os dados disponíveis na literatura acerca do efeito antidepressivo do AA, especificamente no que diz respeito ao mecanismo de ação dessa vitamina. Outro aspecto importante é que os dados resultantes desse trabalho sugerem que essa vitamina não possui um efeito antimaníaco, ao menos nos parâmetros comportamentais, modelo animal e doses aqui utilizadas.

7. CONCLUSÕES

Em relação à caracterização do mecanismo de ação antidepressiva do AA, podemos concluir que o efeito desse composto é dependente da ativação de receptores opióides, especialmente do tipo $\mu 1$. Além disso, a ativação da via mTOR-PSD95 pelo AA, parece não ser dependente da ativação do sistema opióide. Esses achados reforçam a importância do sistema opióide na ação de compostos com atividade antidepressiva e estende o conhecimento científico acerca dos mecanismos implicados no efeito antidepressivo do AA.

No que diz respeito ao potencial efeito antimaníaco do AA, os dados comportamentais desse trabalho não confirmaram essa possibilidade. Apesar de o AA não apresentar um efeito antimaníaco nesse modelo e doses utilizadas, essa vitamina ajudou a proteger o encéfalo das alterações causadas pela m-AMPH sobre o imunoconteúdo de BDNF no córtex pré-frontal.

Em conjunto nossos dados sugerem que o AA pode ser uma alternativa para o tratamento da depressão, entretanto o efeito antimaníaco dessa vitamina deve ser melhor investigado.

8. PERSPECTIVAS

- Investigar o potencial de um agonista de receptores opióides, como a morfina, em potencializar o efeito de uma dose sub-ativa de AA no TSC.
- Avaliar se o efeito sinérgico entre AA e MK-801, um antagonista de receptores NMDA, é bloqueado pela administração de um antagonista de receptores opióides, a naloxona.
- Investigar o envolvimento dos demais receptores opióides (δ e κ) no efeito tipo-antidepressivo do AA no TSC.
- Avaliar o efeito do tratamento por 7 dias com AA em um modelo de reversão de mania induzida por anfetamina (14 dias) sobre a locomoção dos animais no TCA e sobre o imunoconteúdo de BDNF, FGF-2 no córtex pré-frontal e hipocampo dos animais.

9. REFERÊNCIAS

AGUS, D.B.; GAMBHIR, S. S.; PARDRIDGE, W.M.; SPIELHOLZ, C.; BASELGA, J.; VERA, J.C.; GOLDE, D.W. Vitamin C crosses the blood-brain barrier in the oxidized form through the glucose transporters. **J. Clin. Invest.**, v. 100, p. 2842-2848, 1997.

ALCANTARA, I.; SCHMITT, R.; SCHWARZTHAUP, A. W.; CHACHAMOVICH, E.; SULZBACH, M. F. V.; PADILHA, R. T. DE L.; CANDIAGO, R. H.; LUCAS, R. M. Avanços no diagnóstico do transtorno de humor bipolar. **R. Psiquiatr. RS**, v. 25, n. 1, p. 22-32, 2003.

AMR, M.; EL-MOGY, A.; SHAMS, T.; VIEIRA, K.; LAKHAN, S. E. Efficacy of vitamin C as an adjunct to fluoxetine therapy in pediatric major depressive disorder: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study. **Nutr J.**, v. 9, p. 12-31, 2013.

ANDREAZZA, A. C.; KAUER-SANT'ANNA, M.; FREY, B. N.; STERTZ, L.; ZANOTTO, C.; RIBEIRO, L.; GIASSEN, K.; VALVASSORI S. S.; RÉUS, G. Z.; SALVADOR, M.; QUEVEDO, J.; GONÇALVES C. A.; KAPCZINSKI, F. Effects of mood stabilizers on DNA damage in an animal model of mania. **J Psychiatry Neurosci.**, v. 33, n. 6, p. 516-524, 2008.

BEAULIEU, J. M.; GAINETDINOV, R. R.; CARON, M. G. Akt/GSK3 Signaling in the Action of Psychotropic Drugs. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 49, n., p. 327-347, 2009.

BELMAKER, R. H. Bipolar disorder. **The New England Journal of Medicine**, v. 351, p. 476-486, 2004.

BERK, M.; KAPCZINSKI, F.; ANDREAZZA, A. C.; DEAN, O. M.; GIORLANDO, F.; MAES, M.; YÜCEL, M.; GAMA, C. S.; DODD, S.; DEAN, B.; MAGALHÃES, P. V.; AMMINGER, P.; MCGORRY, P.; MALHI, G. S. Pathways underlying neuroprogression in bipolar disorder: focus on inflammation, oxidative stress and neurotrophic factors. **Neurosci Biobehav Rev.**, v.35, n 3, p. 804-817, 2011.

BERTON, O.; NESTLER, E. J. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. **Nat Rev Neurosci**, v. 7, n. 2, p. 137-151, 2006.

BINFARE, R. W.; ROSA, A. O.; LOBATO, K. R.; SANTOS, A. R.; RODRIGUES, A. L. Ascorbic acid administration produces an antidepressant-like effect: evidence for the involvement of monoaminergic neurotransmission. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 33, n. 3, p. 530-540, 2009.

BODKIN, J.A., ZORNBERG, G.L., LUKAS, S.E., COLE, J.O. Buprenorphine treatment of refractory depression. **J Clin Psychopharmacol.**, v. 15, p. 49-57, 1995.

BRUGUE, E.; VIETA, E. Atypical antipsychotics in bipolar depression: neurobiological basis and clinical implications. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 31, n., p. 275-282, 2007.

BROCARD, P. S.; BUDNI, J.; LOBATO, K. R.; SANTOS, A.R.; RODRIGUES, A.L. Evidence for the involvement of the opioid system in the antidepressant-like effect of folic acid in the mouse forced swimming test. **Behav Brain Res.**, v. 200, p. 122-127, 2009.

BROCARD, P. S.; BUDNI, J.; PAVESI, E.; FRANCO, J. L.; ULIANO-SILVA, M.; TREVISAN, R.; TERENCE, M. G.; DAFRE, A. L.; RODRIGUES, A. L. Folic acid administration prevents ouabain-induced hyperlocomotion and alterations in oxidative stress markers in the rat brain. **Bipolar Disord.**, v. 12, n. 4, p. 414-424, 2010.

BRODY, S. High-dose ascorbic acid increases intercourse frequency and improves mood: a randomized controlled clinical trial. **Biol Psychiatry**, v. 52, n. 4, p. 371-374, 2002.

BROWN, E.S., SUPPES, T., ADINOFF, B., THOMAS, N.R. Drug abuse and bipolar disorder: comorbidity or misdiagnosis? **J Affect Disord.**, v. 65, p. 105-115, 2001.

BÜCKER, J.; FRIES, G. R.; KAPCZINSKI, F.; POST, R. M.; YATHAM, L. N.; VIANNA, P.; BOGO CHIES, J. A.; GAMA, C. S.; MAGALHÃES, P. V.; AGUIAR, B. W.; PFAFFENSELLER, B.; KAUFER-SANT'ANNA, M. Brain-derived neurotrophic factor and

inflammatory markers in school-aged children with early trauma. **Acta Psychiatr. Scand.**, 2014. *In press*.

CAPPELIEZ, P.; MOORE, E. Effect of lithium on an amphetamine animal model of bipolar disorder. **Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 14, p. 347–358, 1990.

CASTRÉN E. Is mood chemistry? **Nat Rev Neurosci.**, v. 6, p. 241-246, 2005.

CATLIN, D.H., GORELICK, D.A., GERNER, R.H., HUI, K.K., AND LI, C.H. Clinical effects of beta-endorphin infusions. **Adv. Biochem. Psychopharmacol.**, v. 22, p. 465–472, 1980.

CECHINEL-RECCO, K.; VALVASSORI, S. S.; VARELA, R. B.; RESENDE, W. R.; ARENT, C. O.; VITTO, M. F.; LUZ, G.; DE SOUZA, C. T.; QUEVEDO, J. Lithium and tamoxifen modulate cellular plasticity cascades in animal model of mania. **J Psychopharmacol.**, v. 26, n. 12, p. 1594-1604, 2012.

CHANG, C. W.; CHEN, M. J.; WANG, T. E.; CHANG, W. H.; LIN, C. C.; LIU, C. Y. Scurvy in a patient with depression. **Dig Dis Sci.**, v. 52, n. 5, p. 1259-1261, 2007.

CHEN, Q.; ESPEY, M. G.; SUN, A. Y.; POOPUT, C.; KIRK, K. L.; KRISHNA, M. C.; KHOSK, D. B.; DRISKO, J.; LEVINE, M. Pharmacologic doses of ascorbate act as a prooxidant and decrease growth of aggressive tumor xenografts in mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 105, n. 32, p. 11105-11109, 2008.

COCCHI, P.; SILENZI, M.; CALABRI, G.; SALVI, G. Antidepressant effect of vitamin C. **Pediatrics.**, v. 65, n. 4, p. 862-863, 1980.

CORDOVA FM, RODRIGUES AL, GIACOMELLI MB, OLIVEIRA CS, POSSER T, DUNKLEY PR, et al. Lead stimulates ERK1/2 and p38MAPK phosphorylation in the hippocampus of immature rats. **Brain Res.**, v. 998, p. 65-72, 2004.

CRYAN JF, VALENTINO RJ, LUCKI I. Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified

rat forced swimming test. **Neurosci Biobehav Rev.**, v. 29, p. 547-569, 2005.

CRYAN, J. F.; SLATTERY, D. A. GABAB receptors and depression. Current status. **Adv. Pharmacol.**, v. 58, p. 427-451, 2010.

CUMMINGS, J. L. The neuroanatomy of depression. **J Clin Psychiatry**, v. 54, p. 14-20, 1993.

CUNHA, A. B.; FREY, B. N.; ANDREAZZA, A. C.; GOI, J. D.; ROSA, A. R.; GONCALVES, C. A.; SANTIN, A.; KAPCZINSKI, F. Serum brain-derived neurotrophic factor is decreased in bipolar disorder during depressive and manic episodes. **Neurosci. Lett.**, v. 398, p. 215-219, 2006.

DA-ROSA, D. D.; VALVASSORI, S. S.; STECKERT, A. V.; ARENT, C. O.; FERREIRA, C. L.; LOPES-BORGES, J.; VARELA, R. B.; MARIOT, E.; DAL-PIZZOL, F.; ANDERSEN, M. L.; QUEVEDO, J. Differences between dextroamphetamine and methamphetamine: behavioral changes and oxidative damage in brain of Wistar rats. **J. Neural Transm.**, v. 119, p. 31-38, 2012.

DIAGNOSTIC AND STATISTICAL MANUAL OF MENTAL DISORDERS, 5TH EDITION (DSM-V) **American Psychiatric Association**, Washington, D.C., 2013.

DJUROVIĆ, D., MILIĆ-ASKRABIĆ, J., MAJKIĆ-SINGH, N. Serum beta-endorphin level in patients with depression on fluvoxamine. **Farmaco.**, v. 54, p. 130-133, 1999.

DUMAN, R. S.; LI, N.; LIU, R. J.; DURIC, V.; AGHAJANIAN, G. Signaling pathways underlying the rapid antidepressant actions of ketamine. **Neuropharmacology**, v. 62, p.35-41, 2012.

EBMEIER, K. P.; DONAGHEY, C.; STEELE, J.C. Recent developments and current controversies in depression. **Lancet**, v. 367, n. 9505, p. 153-167, 2006.

EINAT, H.; YUAN, P.; SZABO, S. T.; DOGRA, S.; MANJI, H. K. Protein kinase C inhibition by tamoxifen antagonizes manic-like

behavior in rats: implications for the development of novel therapeutics for bipolar disorder. **Neuropsychobiology**, v. 55, p. 123-131, 2007.

ELHWUEGI, A. S. Central monoamines and their role in major depression. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 28, n. 3, p. 435-451, 2004.

ELLENBROEK, B. A.; COOLS, A. R. Animal models with construct validity for schizophrenia. **Behavioural Pharmacology** v. 6, p. 469-490, 1990.

EREN, I.; NAZIROGLU, M.; DEMIRDAS, A. Protective effects of lamotrigine, aripiprazole and escitalopram on depression-induced oxidative stress in rat brain. **Neurochem. Res.**, v. 32, p. 1188-1195, 2007.

EHRICH, E.; TURNCLIFF, R.; DU, Y.; LEIGH-PEMBERTON, R.; FERNANDEZ, E.; JONES, R.; FAVA, M. Evaluation of Opioid Modulation in Major Depressive Disorder. **Neuropsychopharmacology**, 2015. *In press*.

ESCHALIER, A.; FIALIP, J.; VAROQUAUX, O. ; MAKAMBILA, M.C. Study of the clomipramine–morphine interaction in the forced swimming test in mice. **Psychopharmacology**, v. 93,p. 515–519, 1987.

EVANS, S. J.; CHOUDARY, P. V.; NEAL, C. R.; LI, J. Z.; VAWTER, M. P.; TOMITA, H.; LOPEZ, J. F.; THOMPSON, R. C.; MENG, F.; STEAD, J. D.; WALSH, D. M.; MYERS, R. M.; BUNNEY, W. E.; WATSON, S. J.; JONES, E. G.; AKIL, H. Dysregulation of the fibroblast growth factor system in major depression. **Proc Natl Acad Sci U.S.A.**, v. 101, n. 43, p. 15506-11, 2004.

FERNANDES, B. S.; GAMA, C. S.; KAUER-SANT'ANNA, M.; LOBATO, M. I.; BELMONTE-DE-ABREU, P.; KAPCZINSKI, F. Serum brain-derived neurotrophic factor in bipolar and unipolar depression: a potential adjunctive tool for differential diagnosis. **J. Psychiatr.Res.**, v. 43, p. 1200–1204, 2009.

FERNANDES, B. S.; GAMA, C. S.; CERESÉR, K. M. Brain-derived neurotrophic factor as a state-marker of mood episodes in bipolar

disorders: a systematic review and meta-regression analysis. **J. Psychiatr. Res.**, v. 45, n. 8, p. 995–1004, 2011.

FREITAS, R. M. DE; TOMÉ, A. DA R. Ações neuroprotetoras da vitamina C no corpo estriado de ratos após convulsões induzidas pela pilocarpina. **Revista de psiquiatria clínica.**, v. 37, n. 3, p. 105-108, 2010.

FREITAS, A. E.; MACHADO, D. G.; BUDNI, J.; NEIS, V. B.; BALEN, G. O.; LOPES, M. W.; DE SOUZA, L. F.; VERONEZI, P. O.; HELLER, M.; MICKE, G. A.; PIZZOLATTI, M. G.; DAFRE, A. L.; LEAL, R. B.; RODRIGUES, A. L. Antidepressant-like action of the bark ethanolic extract from *Tabebuia avellanedae* in the olfactory bulbectomized mice. **J Ethnopharmacol.**, v. 145, n. 3, p. 737-745, 2013.

FREY, B. N.; ANDREAZZA, A. C.; CERESÉR, K. M.; MARTINS, M. R.; VALVASSORI, S. S.; RÉUS, G. Z.; QUEVEDO, J.; KAPCZINSKI, F. Effects of mood stabilizers on hippocampus BDNF levels in an animal model of mania. **Life Sciences**, v. 79, p. 281-286, 2006.

GALEOTTI, N.; BARTOLINI, A.; GHELARDINI, C. Blockade of intracellular calcium release induces an antidepressant-like effect in the mouse forced swimming test. **Neuropharmacology**, v. 50, n. 3, p. 309-316, 2006.

GARERI, P.; FALCONI, U.; DE FAZIO, P.; DE SARRO, G. Conventional and new antidepressant drugs in the elderly. **Prog Neurobiol.**, v. 61, n. 4, p. 353-396, 2000.

GAUGHRAN, F.; PAYNE, J.; SEDGWICK, P. M.; COTTER, D.; BERRY, M. Hippocampal FGF-2 and FGFR1 mRNA expression in major depression, schizophrenia and bipolar disorder. **Brain Res. Bull.**, v. 70, p. 221–227, 2006.

GAUTAM, M.; AGRAWAL, M.; GAUTAM, M.; SHARMA, P.; GAUTAM, A. S.; GAUTAM, S. Role of antioxidants in generalised anxiety disorder and depression. *Indian journal of psychiatry*, v. 54, n. 3, p.244-247, 2012.

GRANDE, I.; MAGALHÃES, P. V.; CHENDO, I.; STERTZ, L.; FRIES, G. R.; CERESER, K. M.; CUNHA, A. B.; GÓI, P.; KUNZ, M.; UDINA, M.; MARTÕN-SANTOS, R.; FREY, B. N.; VIETA, E.; KAPCZINSKI, F. Val66Met polymorphism and serum brain-derived neurotrophic factor in bipolar disorder: an open-label trial. **Acta Psychiatr Scand.**, v.129, n. 5, p.393-400, 2014.

GRUNEWALD, R. A. Ascorbic acid in the brain. **Brain Res Brain Res Ver.**, v. 18, p. 123-133, 1993.

HARKIN, A. J.; BRUCE, K. H.; CRAFT, B.; PAUL, I. A. Nitric oxide synthase inhibitors have antidepressant-like properties in mice 1. Acute treatments are active in the forced swim test. **Eur J Pharmacol**, v. 372, n. 3, p. 207-213, 1999.

HARRISON, F.E.; MAY, J.M. Vitamin C function in the brain: vital role of the ascorbate transporter SVCT2. **Free Radic Biol Med.**, v. 46, n. 6, p. 719-30, 2009.

HARRISON, F. E.; HOSSEINI, A. H.; MCDONALD, M. P.; MAY, J. M. Vitamin C reduces spatial learning deficits in middle-aged and very old APP/PSEN1 transgenic and wild-type mice. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 93, n. 4, p. 443-450, 2009.

HEIKKILA, R. E.; CABBAT, F. S.; MANZINO, L. Differential inhibitory effects of ascorbic acid on the binding of dopamine agonists and antagonists to neostriatal membrane preparations: correlations with behavioral effects. **Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.**, v. 34, p. 409-421, 1981.

HENN, F. A.; VOLLMAYR, B. Stress models of depression: forming genetically vulnerable strains. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 29, n. 4-5, p. 799-804, 2005.

HSU, D. T.; SANFORD, B. J.; MEYERS, K. K.; LOVE, T. M.; HAZLETT, K. E.; WALKER, S. J.; MICKEY, B. J.; KOEPPE, R. A.; LANGENECKER, S. A.; ZUBIETA J. K. It still hurts: altered endogenous opioid activity in the brain during social rejection and acceptance in major depressive disorder. **Molecular Psychiatry**, 2015. *In press.*

HUXLEY, N.; BALDESSARINI, R.J. Disability and its treatment in bipolar disorder patients. **Bipolar Disorders** v. 9, p. 183-196, 2007.

JOYCE, P. R.; FERGUSON, D. M.; WOOLLARD, G.; ABBOTT, R. M.; HORWOOD, L. J.; UPTON, J. Urinary catecholamines and plasma hormones predict mood state in rapid cycling bipolar affective disorder. **Journal Affective Disorders**, v. 33, p. 233-243, 1995.

KASTER, M.P., BUDNI, J., SANTOS, A.R.S., RODRIGUES, A.L.S. Pharmacological evidence for the involvement of the opioid system in the antidepressant-like effect of adenosine in the mouse forced swimming test. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 576, p. 91-98, 2007.

KASTER, M. P.; GADOTTI, V. M.; CALIXTO, J. B.; SANTOS, A. R.; RODRIGUES, A. L. Depressive-like behavior induced by tumor necrosis factor- α in mice. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 419-426, 2012.

KAYAALP, S. O.; NEFF, N. H. Differentiation by ascorbic acid of dopamine agonist and antagonist binding sites in striatum. **Life Sci.**, v. 26, p. 1837-1841, 1980.

KESSLER, R. C.; AGUILAR-GAXIOLA, S.; ALONSO, J.; CHATTERJI, S.; LEE, S.; ORMEL, J.; USTÜN, T. B.; WANG, P. S. The global burden of mental disorders: an update from the WHO World Mental Health (WMH) surveys. **Epidemiol Psychiatr Soc.**, v. 18, p. 23-33, 2009.

KHAN, A.; FAUCETT, J.; MORRISON, S.; BROWN W. A. Comparative Mortality Risk in Adult Patients With Schizophrenia, Depression, Bipolar Disorder, Anxiety Disorders, and Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder Participating in Psychopharmacology Clinical Trials. **JAMA Psychiatry**, v. 70, n. 10, p. 1091-1099, 2013.

KHANZODE, S. D.; DAKHALE, G. N.; KHANZODE, S. S.; SAOJI, A.; PALASODKAR, R. Oxidative damage and major depression: the potential antioxidant action of selective serotonin re-uptake inhibitors. **Redox Report.**, v. 8, n. 6, p. 365-370, 2003.

KLINE, N.S., LI, C.H., LEHMANN, H.E., LAJTHA, A., LASKI, E., AND COOPER, T. Beta-endorphin-induced changes in schizophrenic

and depressed patients. **Arch Gen Psychiatry**, v. 34, p. 1111–1113, 1977.

KRISHNAN, V.; NESTLER, E.J. The molecular neurobiology of depression. **Nature** 455: 894-902, 2008.

KUMAR, R. S.; NARAYANAN, S. N.; NAYAK, S. Ascorbic acid protects against restraint stress-induced memory deficits in Wistar rats. **Clinics (Sao Paulo)**, v. 64, n. 12, p. 1211-1217, 2009.

KUNUGI, H.; HORI, H.; ADACHI, N.; NUMAKAWA, T. Interface between hypothalamic-pituitary-adrenal axis and brain-derived neurotrophic factor in depression. **Psychiatry Clin. Neurosci.**, v. 64, n. 5, p. 447-459, 2010.

LEAL RB, CORDOVA FM, HERD L, BOBROVSKAYA L, DUNKLEY PR. Lead-stimulated p38MAPK-dependent Hsp27 phosphorylation. **Toxicol Appl Pharmacol.**, v. 178, p. 44-51, 2002.

LEE, J.; DUAN, W.; MATTSO, M. P. Evidence that brain-derived neurotrophic factor is required for basal neurogenesis and mediates, in part, the enhancement of neurogenesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice. **J Neurochem.**, v. 82, n. 6, p. 1367-75, 2002.

LI, N.; LEE, B.; LIU, R. J.; BANASR, M.; DWYER, J. M.; IWATA, M.; LI, X. Y.; AGHAJANIAN, G.; DUMAN, R. S. mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. **Science**, v. 329, n. 5994, p. 959 – 964, 2010.

LIN, P.Y. State-dependent decrease in levels of brain derived neurotrophic factor in bipolar disorder: a meta analytic study. **Neurosci.Lett.**, v. 466, p. 139–143, 2009.

LIU, X.; ZHANG, T.; HE, S.; HONG, B.; CHEN, Z.; PENG, D.; WU, Y.; WEN, H.; LIN, Z.; FANG, Y.; JIANG, K. Elevated serum levels of FGF-2, NGF and IGF-1 in patients with manic episode of bipolar disorder. **Psychiatry Res.**, v. 218, n. 1-2, p. 54-60, 2014.

LU, B.; PANG, P. T.; WOO, N. H. The yin and yang of neurotrophin action. **Neuroscience**, v. 6, p. 603-614, 2005.

MACHADO-VIEIRA, R.; DIETRICH, M. O.; LEKE, R.; CERESER, V. H.; ZANATTO, V.; KAPCZINSKI, F.; SOUZA, D. O.; PORTELA, L. V.; GENTIL, V. Decreased plasma brain derived neurotrophic factor levels in unmedicated bipolar patients during manic episode. **Biol. Psychiatry**, v. 61, p. 142–144, 2007.

MAES, M.; YIRMYIA, R.; NORABERG, J.; BRENE, S.; HIBBELN, J.; PERINI, G.; KUBERA, M.; BOB, P.; LERER, B.; MAJ, M. The inflammatory & neurodegenerative (I&ND) hypothesis of depression: leads for future research and new drug developments in depression. **Metab. Brain Dis.**, v. 24, n. 1, p. 27-53, 2009.

MANN, J. J.; CURRIER, D. M. Stress, genetics and epigenetic effects on the neurobiology of suicidal behavior and depression. **Eur. Psychiatry**, v. 25, n. 5, p. 268-271, 2010.

MANSOUR, A.; KHACHATURIAN, H.; LEWIS, M.E.; AKIL, H.; WALTSON, S.J. Anatomy of CNS opioid receptors. **Trends Neurosci.**, v.11, n., p. 308-314, 1988.

MAZE, M., FUJINAGA, M. Recent advances in understanding the actions and toxicity of nitrous oxide. **Anaesthesia**, v. 55, p. 311-314, 2000.

MILLER, A. H.; MALETIC, V.; RAISON, C. L. Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. **Biol. Psychiatry**, v. 65, n. 9, p. 732-741, 2009.

MORETTI, M.; FREITAS, A. E.; BUDNI, J.; FERNANDES, S. C.; BALEN, G. D.; RODRIGUES, A. L. S. Involvement of nitric oxide-cGMP pathway in the antidepressant-like effect of ascorbic acid in the tail suspension test. **Behav. Brain Res.**, v. 225, n. 1, p. 328–333, 2011.

MORETTI, M.; COLLA, A.; DE OLIVEIRA BALEN, G.; DOS SANTOS, D. B.; BUDNI, J.; DE FREITAS, A. E.; FARINA, M.; RODRIGUES, A. L. S. Ascorbic acid treatment, similarly to fluoxetine, reverses depressive-like behavior and brain oxidative damage induced by chronic unpredictable stress. **J. Psychiatr. Res.**, v. 46, n. 3, p. 331–340, 2012a.

MORETTI, M.; BUDNI, J.; RIBEIRO, C. M.; RODRIGUES, A. L. Involvement of different types of potassium channels in the antidepressant-like effect of ascorbic acid in the mouse tail suspension test. **Eur J Pharmacol.**, v. 687, n. 1-3, p. 21-27, 2012b.

MORETTI, M.; BUDNI, J.; DOS SANTOS, D. B.; ANTUNES, A.; DAUFENBACH, J. F.; MANOSSO, L. M.; FARINA, M.; RODRIGUES, A. L. Protective effects of ascorbic acid on behavior and oxidative status of restraint-stressed mice. **J Mol Neurosci.**, v. 49, p. 68-79, 2013.

MORETTI, M.; BUDNI, J.; FREITAS, A. E.; ROSA, P. B.; RODRIGUES, A. L. Antidepressant-like effect of ascorbic acid is associated with the modulation of mammalian target of rapamycin pathway. **J Psychiatr Res.**, v. 48, p. 16-24, 2014.

MÜLLER-OERLINGHAUSEN, B.; BERGHÖFER, A.; BAUER, M. Bipolar disorder. **Lancet.**, v. 359, n. 9302, p. 241-247, 2002.

NAIDU, K. A. Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. **Nutr J.**, v. 2, p. 7, 2003.

NAKAGAWA, Y.; ISHIMA, T.; ISHIBASHI, Y.; YOSHII, T.; TAKASHIMA, T. Involvement of GABA(B) receptors systems in action of antidepressants: baclofen but not bicuculline attenuates the effects of antidepressants on the forced swim test in rats. **Brain Res.**, v. 741, n. 1-2, p. 240-245, 1996.

NAKAJIMA, S.; SUZUKI, T.; WATANABE, K.; KASHIMA, H.; UCHIDA, H. Accelerating response to antidepressant treatment in depression: a review and clinical suggestions. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v. 34, n. 2, p.259-264, 2010.

NEMEROFF, C. B. The burden of severe depression: A review of diagnostic challenges and treatment alternatives. **J Psychiatr Res.**, v. 41, n. 3-4, p. 189-206, 2007.

NESTLER, E. J.; BARROT, M.; DILEONE, R. J.; EISCH, A. J.; GOLD, S. J.; MONTEGGIA, L. M. Neurobiology of depression. **Neuron**, v. 34, n. 1, p. 13-25, 2002.

NESTLER, E. J.; CARLEZON, W.A. The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. **Biol. Psychiatry**, v. 59, n. 12, p. 1151-1159, 2006.

NICIU, M.J.; IONESCU, D.F.; MATHEWS, D.C.; RICHARDS, E.M.; ZARATE JR, C.A. Second messenger/signal transduction pathways in major mood disorders: moving from membrane to mechanism of action, part II: bipolar disorder. **CNS Spectrums**. v. 11, p. 1-10, 2013.

NUMAKAWA, T.; SUZUKI, S. KUMAMARU, E.; ADACHI, N.; RICHARDS, M.; KUNUGI, H. BDNF function and intracellular signaling in neurons. **Histol. Histopathol.**, v. 25, n. 2 , p. 237-258, 2010.

OISHI, J.; DOI, H.; KAWAKAMI, N. Nutrition and Depressive Symptoms in Community-dwelling Elderly Persons in Japan. **Acta Med. Okayama.**, v. 63, p. 9-17, 2009.

OLESEN, J.; LEONARDI, M. The burden of brain diseases in Europe. **Eur J Neurol**, v. 10, n. 5, p. 471-477, 2003.

OLIVEIRA RM, GUIMARAES FS, DEAKIN JF. Expression of neuronal nitric oxide synthase in the hippocampal formation in affective disorders. **Braz J Med Biol Res.**, v. 41, p. 333-341, 2008.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. The Global Burden Of Disease 2004 Update. 2004. Disponível em: http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GBD_report_2004update_full.pdf Acessado em: 10.02.2015.

PADAYATTY, S. J.; KATZ, A.; WANG, Y.; ECK, P.; KWON, O.; LEE, J. H.; CHEN, S.; CORPE, C.; DUTTA, A.; DUTTA, S. K.; LEVINE, M. Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. **J Am Coll Nutr.**, v. 22, p. 18-35, 2003.

PERERA, T. D.; COPLAN, J. D.; LISANBY, S. H.; LIPIRA, C. M.; ARIF, M.; CARPIO, C.; SPITZER, G.; SANTARELLI, L.; SCHARF, B.; HEN, R.; ROSOKLIJA, G.; SACKEIM, H. A.; DWORK, A. J. Antidepressant-induced neurogenesis in the hippocampus of adult nonhuman primates. **J. Neurosci.**, v. 27, n. 18, p. 4894-4901, 2007.

PETERSON GL. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. **Anal Biochem.**, v. 83, p. 346-356. 1977.

PICCHINI, A. M.; MANJI, H. K.; GOULD, T. D. GSK-3 and neurotrophic signaling: novel targets underlying the pathophysiology and treatment of mood disorders? **Drug Discovery Today: Disease Mechanisms**, v. 1, n., p. 419-428, 2004.

PICCINNI, A.; VELTRI, A.; COSTANZO, D.; VANELLI, F.; FRANCESCHINI, C.; MORONI, I.; DOMENICI, L.; ORIGLIA, N.; MARAZZITI, D.; AKISKAL, H. S.; DELL'OSSO, L. Decreased plasma levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) during mixed episodes of bipolar disorder. **J. Affect Disord.**, 2015. *In Press*.

PICKAR, D.; CUTLER, N. R.; NABER, D.; POST, R. M.; BUNNEY, W. E. Plasma opioid activity and manic-depressive illness. **Lancet**, v. 1, p. 937, 1980.

PITTENGER, C.; DUMAN, R. S. Stress, depression, and neuroplasticity: a converge of mechanisms. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, n. 1, p. 88-109, 2008.

POLYAKOVA, M.; STUKE, K.; SCHUEMBERG, K.; MUELLER, K.; SCHOENKNECHT, P.; SCHROETER, M. L. BDNF as a biomarker for successful treatment of mood disorders: A systematic & quantitative meta-analysis. **J. Affect. Disord.**, v. 174, p.432-440, 2014. *In press*.

PORSOLT, R. D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Arch Int Pharmacodyn Ther**, v. 229, n. 2, p. 327-336, 1977.

PORSOLT, R. D.; ANTON, G.; BLAVET, N.; JALFRE, M. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. **Eur J Pharmacol.**, v.47, n. 04, p. 379-391, 1978.

POSSER T, DEAGUIAR CB, GARCEZ RC, ROSSI FM, OLIVEIRA CS, TRENTIN AG, et al. Exposure of C6 glioma cells to PB (II) increases the phosphorylation of p38 (MAPK) and JNK1/2 but not ERK1/2. **Arch Toxicol.**, v. 81, p. 407-414, 2007.

POTTER, W. Z.; RUDORFER, M. V.; PICKAR, D.; LINNOILA, M. Effects of psychotropic drugs on neurotransmitters in man. **Life Sci.**, v. 41, n. 7, p. 817-820, 1987.

PRANGE, A.J. JR, WILSON, I.C., LYNN, C.W., ALLTOP, L.B., STIKELEATHER, R.A. Ltryptophan in mania. Contribution to a permissive hypothesis of affective disorders. **Arch Gen Psychiatry**, v. 30, p. 56-62, 1974.

PRINCE, M.; PATEL, V.; SAXENA, S.; MAJ, M.; MASELKO, J.; PHILLIPL, M. R.; RAHMAN, A. No health without mental health. **Lancet**, v. 370, p. 859-877, 2007.

PRINS, J.; OLIVIER, B.; KORTE, S. M. Triple reuptake inhibitors for treating subtypes of major depressive disorder: the monoamine hypothesis revisited. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 20, n. 8, p. 1107-1130, 2011.

REBEC, G. V.; PIERCE, R. C. A Vitamin as Neuromodulator - Ascorbate Release into the Extracellular Fluid of the Brain Regulates Dopaminergic and Glutamatergic Transmission. **Prog Neurobiol.**, v. 43, p. 537-565, 1994.

REUSS, B.; VON BOHLEN UND HALBACH, O. Fibroblast growth factors and their receptors in the central nervous system. **Cell and Tissue Research**, v. 313, p. 139–157, 2003.

RICE, M. E. Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the brain. **Trends in Neurosciences**, v. 23, p. 209-216, 2000.

ROJAS-CORRALES, M. O.; GIBERT-RAHOLA, J.; MICO, J. A. Tramadol induces antidepressant-type effects in mice. **Life Sci.**, v. 63, p. 175–180, 1998.

ROJAS-CORRALES, M. O.; BERROCOSO, E.; GIBERT-RAHOLA, J.; MICO, J. A. Antidepressant-like effects of tramadol and other central analgesics with activity on monoamines reuptake, in helpless rats. **Life Sci.**, v. 72, p. 143–152, 2002.

ROSA, K. A.; GADOTTI, V. de M.; ROSA, A. O. da; RODRIGUES, A. L. S.; CALIXTO, J. B.; SANTOS, A. R. S. Evidence for the

involvement of glutamatergic system in the antinociceptive effect of ascorbic acid. **Neuroscience Lett.**, v. 381, n.1-2, p. 185-188, 2005.

ROSA, A. R.; FREY, B. N.; ANDREAZZA, A. C.; CERESER, K. M.; CUNHA, A. B.; QUEVEDO, J.; SANTIN, A.; GOTTFRIED, C.; GONÇALVES, C. A.; VIETA, E.; KAPCZINSKI, F. Increased sérum glial cell line-derived neurotrophic factor immunocontent during manic and depressive episodes in individuals with bipolar disorder. **Neurosci. Lett.**, v. 407, p. 146–150, 2006.

SANACORA, G.; ZARATE, C. A.; KRYSTAL, J. H.; MANJI, H.K. Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 7, n. 5, p. 426-437, 2008.

SAWYNOK, J., ESSER, M. J., REID, A. R. Antidepressants as analgesics: an overview of central and peripheral mechanisms of action. *J Psychiatry Neurosci.*, v. 26, p. 21-29, 2001.

SCHANDERL, S.H. Vitamin assay. In: *Methods in food analysis. Physical, chemical and instrumental methods of analysis.* **Academic Press, New York**, p.845, 1970.

SCHREIBER, M.; TROJAN, S. Ascorbic-Acid in the Brain. **Physiological Research.** v. 40, n. 4, p. 413-418, 1991.

SCHREIBER, S., BLEICH, A., PICK, C.G. Venlafaxine and mirtazapine: diferente mechanisms of antidepressant action, common opioid-mediated antinociceptive effects--a possible opioid involvement in severe depression? **J Mol Neurosci.**, v. 18, p. 143-149, 2002.

SHIAH, I.S., YATHAM, L.N. Serotonin in mania and in the mechanism of action of mood stabilizers: a review of clinical studies. **Bipolar Disord.**, v. 2, p. 77-92, 2000.

STAMFORD, J. A.; ISAAC, D.; HICKS, C. A.; WARD, M. A.; OSBORNE, D. J.; ONEILL, M. J. Ascorbic acid is neuroprotective against global ischaemia in striatum but not hippocampus: histological and voltammetric data. **Brain Res.**, v. 835, n. 2, p. 229-240, 1999.

STERU, L.; CHERMAT, R.; THIERRY, B.; SIMON, P. The Tail Suspension Test - a New Method for Screening Antidepressants in Mice. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 85, n. 3, p. 367-370, 1985.

STOLL, A. L., RUETER, S. Treatment augmentation with opiates in severe and refractory major depression. **Am J Psychiatry**, v. 156, p. 2017, 1999.

STRASSER, H. C.; LILYESTROM, J.; ASHBY, E. R.; HONEYCUTT, N. A.; SCHRETLEN, D. J.; PULVER, A. E.; HOPKINS, R. O.; DEPAULO, J. R.; POTASH, J. B.; SCHWEIZER, B.; YATES, K. O.; KURIAN, E.; BARTA, P. E.; PEARLSON, G.D. Hippocampal and ventricular volumes in psychotic and nonpsychotic bipolar patients compared with schizophrenia patients and community control subjects: a pilot study. **Biol Psychiatry**, v. 57, n. 6, p. 633-639, 2005.

SZABO, S. T.; MACHADO-VIEIRA, R.; YUAN, P.; WANG, Y.; WEI, Y.; FALKE, C.; CIRELLI, C.; TONONI, G.; MANJI, H. K.; DU, J. Glutamate receptors as targets of protein kinase C in the pathophysiology and treatment of animal models of mania. **Neuropharmacology**, v. 56, p. 47-55, 2009.

TRAMONTINA, J. F.; ANDREAZZA, A. C.; KAUER-SANT'ANNA, M.; STERTZ, L.; GOI, J.; CHIARANI, F.; KAPCZINSKI, F. Brain-derived neurotrophic factor serum levels before and after treatment for acute mania. **Neurosci. Lett.**, v. 452, p. 111-113, 2009.

TOLBERT, L. C.; THOMAS, T. N.; MIDDAUGH, L. D.; ZEMP, J. W. Ascorbate Blocks Amphetamine-Induced Turning Behavior in Rats with Unilateral Nigro-Striatal Lesions. **Brain Res. Bull.**, v. 4, p. 43-48, 1979.

TOLBERT, L. C.; MORRIS, P. E.; SPOLLEN, J. J.; ASHE, S. C. Stereospecific effects of ascorbic acid and analogues on D1 and D2 agonist binding. **Life Sci.**, v. 51, p. 921-930, 1992.

VAWTER, M. P.; FREED, W. J.; KLEINMAN, J. E. Neuropathology of bipolar disorder. **Biol Psychiatry**, v. 48, n., p. 486-504, 2000.

VILPOUX, C., CARPENTIER, C., LEROUX-NICOLLET, I., NAUDON, L., COSTENTIN, J. Differential effects of chronic

antidepressant treatments on micro- and delta-opioid receptors in rat brain. **Eur J Pharmacol.**, v. 443, p. 85-93, 2002.

WADA, K.; SUGIMORI, H.; BHIDE, P. G.; MOSKOWITZ, M. A.; FINKLESTEIN, S. P. Effect of basic fibroblast growth factor treatment on brain progenitor cells after permanent focal ischemia in rats. **Stroke**, v. 34, n. 11, p. 2722-2728, 2003.

WAGNER, G. C.; CARELLI, R. M.; JARVIS, M. F. Ascorbic acid reduces the dopamine depletion induced by methamphetamine and the 1-methyl-4-phenyl pyridinium ion. **Neuropharmacology**, v. 25, n. 5, p. 559-61, 1986.

WALZ, J. C.; ANDREAZZA, A. C.; FREY, B. N.; CACILHAS, A. A.; CERESER, K. M.; CUNHA, A. B.; WEYNE, F.; STERTZ, L.; SANTIN, A.; GONCALVES, C. A.; KAPCZINSKI, F. Serum neurotrophin-3 is increased during manic and depressive episodes in bipolar disorder. **Neurosci. Lett.**, v. 415, p. 87-89, 2007.

WALZ, J. C.; MAGALHAES, P. V.; GIGLIO, L. M.; CUNHA, A. B.; STERTZ, L.; FRIES, G. R.; ANDREAZZA, A. C.; KAPCZINSKI, F. Increased serum neurotrophin-4/5 levels in bipolar disorder. **J. Psychiatr. Res.**, v. 43, p. 721-723, 2009.

WANG, Y.; WANG, Y. X.; LIU, T.; LAW, P. Y.; LOH, H. H.; QIU Y.; CHEN HZ. μ -Opioid receptor attenuates A β oligomers-induced neurotoxicity through mTOR signaling. **CNS Neurosci Ther.**, v. 21, p. 8-14, 2015.

WHITE, L. K.; MAURER, M.; KRAFT, M. E.; OH, C.; REBEC, G. V. Intrastriatal infusions of ascorbate antagonize the behavioral response to amphetamine. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 36, n. 3, p. 485-489, 1990.

WITTCHEN, H. U.; KNÄUPER, B.; KESSLER, R. C. Lifetime risk of depression. **Br. J. Psychiatry. Suppl.**, v. 26, p. 16-22, 1994.

WOLF, W. A.; MARTIN, J. L.; KARTJE, G. L.; FARRER, R. G. Evidence for fibroblast growth factor-2 as a mediator of amphetamine-enhanced motor improvement following stroke. **PLoS One**, v. 9, 2014.

YANG, C.; LI, W. Y.; YU, H. Y.; GAO, Z. Q.; LIU, X. L.; ZHOU, Z. Q.; YANG, J. J. Tramadol pretreatment enhances ketamine-induced antidepressant effects and increases mammalian target of rapamycin in rat hippocampus and prefrontal cortex. **J Biomed Biotechnol.**, v. 2012, p., 2012.

YOSHIMURA, S.; TERAMOTO, T.; WHALEN, M. J.; IRIZARRY, M. C.; TAKAGI, Y.; QIU, J.; HARADA, J.; WAEBER, C.; BREAKFIELD, X. O.; MOSKOWITZ, M. A. FGF-2 regulates neurogenesis and degeneration in the dentate gyrus after traumatic brain injury in mice. **J Clin Invest.**, v. 112, n. 8, p. 1202-1210, 2003.

YOUNG, J. W.; GOEY, A. K.; MINASSIAN, A.; PERRY, W.; PAULUS, M. P.; GEYER, M. A. GBR 12909 administration as a mouse model of bipolar disorder mania: mimicking quantitative assessment of manic behavior. **Psychopharmacology**, v. 208, p. 443-54, 2010.

ZOMKOWSKI, A. D., SANTOS, A. R., RODRIGUES, A. L. Evidence for the involvement of the opioid system in the agmatine antidepressant-like effect in the forced swimming test. **Neurosci Lett.**, v. 381, p. 279-283, 2005.

ZOMKOWSKI, A. D.; ENGEL, D.; GABILAN, N. H.; RODRIGUES, A. L.S. Involvement of NMDA receptors and L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway in the antidepressant-like effects of escitalopram in the forced swimming test. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 20, n. 11, p. 793-801, 2010.